



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 748**

51 Int. Cl.:
G01N 21/64 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06739657 .2**
96 Fecha de presentación : **24.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1866631**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Dispositivo de detección de fluorescencia múltiple que tiene un haz de fibras que acopla múltiples módulos ópticos a un detector común.**

30 Prioridad: **05.07.2005 US 174755**
01.04.2005 US 667461 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2011

73 Titular/es:
3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY
3M Center, P.O. Box 33427
St. Paul, Minnesota 55133-3427, US

72 Inventor/es: **Bedingham, William;**
Ludowise, Peter, D. y
Robole, Barry, W.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 748 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de detección de fluorescencia múltiple que tiene un haz de fibras que acopla múltiples módulos ópticos a un detector común.

CAMPO TÉCNICO

- 5 La invención se refiere a sistemas de análisis y, más concretamente, técnicas para la detección de varias especies diana usando colorantes fluorescentes.

ANTECEDENTES

- 10 Los sistemas de disco óptico se usan a menudo para realizar varios análisis biológicos, químicos o bioquímicos. En un sistema típico se usa un disco rotatorio como medio para almacenar y procesar especímenes fluidos, tales como sangre, plasma, suero, orina u otros fluidos.

Un tipo de análisis es la reacción en cadena de la polimerasa (abreviado generalmente como PCR por sus iniciales en inglés: polymerase chain reaction) que a menudo se usa para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos. En particular, la PCR se usa a menudo para la secuenciación del ADN, clonación, cartografía genética y otras formas de análisis de secuencia de ácidos nucleicos.

- 15 En general, la PCR se basa en la capacidad de enzimas duplicadoras del ADN para permanecer estables a temperaturas elevadas. Las etapas principales de la PCR son tres: desnaturalización, hibridación y extensión. Durante la desnaturalización, se calienta una muestra líquida a aproximadamente 94°C. Durante este proceso, el ADN de cadena doble "se derrite" hasta ADN de cadena sencilla. Durante la hibridación, el ADN de cadena sencilla se enfría a aproximadamente 54°C. A esta temperatura, los cebadores se unen o "hibridan" a los extremos de los segmentos de ADN que se han de replicar. Durante la extensión, la muestra se calienta a 75°C. A esta temperatura, las enzimas añaden nucleótidos a la secuencia objetivo y, finalmente, se forma una copia complementaria de la plantilla de ADN. La nueva cadena de ADN se convierte en un nuevo objetivo para la siguiente secuencia de eventos, o "ciclo".

- 20 Existen varios instrumentos de PCR diseñados para determinar los niveles de secuencias de ADN y de ARN específicas en la muestra durante la PCR en tiempo real. Muchos de los instrumentos se basan en la utilización de colorantes fluorescentes. En particular, muchos de los instrumentos de PCR en tiempo real detectan una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del producto de la PCR.

- 30 Los instrumentos de PCR en tiempo real convencionales usan diferentes métodos para la detección de diferentes colorantes fluorescentes. Por ejemplo, algunos instrumentos de PCR convencionales incorporan fuentes de luz blanca con ruedas de filtros para resolver espectralmente cada colorante. Las fuentes de luz blanca son lámparas halógenas de tungsteno que tienen una vida útil máxima de unos pocos miles de horas. Las ruedas de filtros son generalmente piezas electromecánicas complicadas que son susceptibles de gastarse.

- 35 En el documento WO 03/058253, se describen sistemas de procesamiento de muestras y métodos para usar estos sistemas para el procesamiento de materiales de las muestras localizados en dispositivos que están separados del sistema, los sistemas de procesamiento de muestras incluyen una base rotatoria sobre la que los dispositivos de procesamiento de muestras se colocan durante la operación de los sistemas y además incluyen aparatos de conexión para permitir una fácil y rápida extracción y/o reemplazo de las placas de la base.

- 40 El documento US-B-6.597.450 describe un aparato y un método que emplean una pluralidad de dispositivos emisores de luz que cada uno puede obtener luz a través de una fibra óptica respectiva hacia una muestra respectiva de una pluralidad de muestras de una manera escalonada en el tiempo.

- 45 El documento US-A-4.343.991 describe un detector de muestras compuesto por un primer grupo de fibras ópticas que tienen superficies de extremo de salida dispuestas en la dirección perpendicular a la dirección de desplazamiento del soporte, un segundo grupo de fibras ópticas que tienen las superficies de extremos de entrada dispuestas enfrente de dichas superficies de extremo de salida del primer grupo de fibras ópticas, varios diodos emisores de luz dispuestos en las proximidades de las superficies de extremos de entrada del primer grupo de fibras ópticas, un solo elemento fotodetector dispuesto en las inmediaciones de las superficies de extremos de salida del segundo grupo de fibras ópticas y un preamplificador conectado al lado de salida de dicho elemento fotodetector.

SUMARIO

La presente invención está definida por las características de las reivindicaciones.

- 50 Aunque el dispositivo puede ser capaz de realizar la PCR en tiempo real, el dispositivo puede ser capaz de analizar cualquier tipo de reacción biológica mientras se produce. El dispositivo puede ser capaz de modular la temperatura de cada reacción independientemente o como un grupo elegido, y el dispositivo puede ser capaz de soportar varias

etapas de reacciones mediante la inclusión de una válvula entre dos cámaras. Esta válvula puede ser abierta durante las reacciones mediante el uso de un láser que suministra una ráfaga de energía a la válvula.

5 En algunos modos de realización, el dispositivo puede ser portátil para permitir la operación en áreas remotas o laboratorios temporales. El dispositivo puede incluir un ordenador de adquisición de datos para analizar las reacciones en tiempo real, o el dispositivo puede comunicar los datos a otro dispositivo mediante interfaces de comunicación por cable o inalámbricas.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se explican en los dibujos que se acompañan y en la descripción que se da a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de los dibujos y a partir de las reivindicaciones.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 es un diagrama de bloques que ilustra un ejemplo de modo de realización de un dispositivo de detección de fluorescencia múltiple.

La FIGURA 2 es un diagrama esquemático que ilustra un ejemplo de módulo óptico que puede corresponder con cualquiera de los varios módulos ópticos del dispositivo de detección de la fluorescencia de la FIGURA 1.

15 La FIGURA 3 es un diagrama de bloques que ilustra un ejemplo de modo de realización del dispositivo de detección de la fluorescencia múltiple con más detalle.

La FIGURA 4 es un diagrama de bloques del detector individual acoplado a cuatro fibras ópticas del haz de fibras ópticas.

20 La FIGURA 5 es un diagrama de flujo que ilustra un ejemplo de operación del dispositivo de detección de fluorescencia múltiple.

Las FIGURAS 6 y 7 muestran los espectros de absorción y de emisión de colorantes fluorescentes usados generalmente que pueden ser utilizados en la PCR múltiple.

Las FIGURAS 8A y 8B ilustran los datos en bruto obtenidos de dos ejemplos de módulos ópticos con un detector individual durante el análisis de PCR.

25 La FIGURA 9 es un gráfico que muestra los datos después de ser ajustados por el desfase temporal.

Las FIGURAS 10A y 10B muestran el límite de detección (LOD) para los datos obtenidos de los dos módulos ópticos del ejemplo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 La FIGURA 1 es un diagrama de bloques que ilustra un ejemplo de modo de realización de un dispositivo 10 de detección de fluorescencia múltiple. En el ejemplo mostrado, el dispositivo 10 tiene cuatro módulos ópticos 16 que proporcionan cuatro "canales" para la detección óptica de cuatro colorantes diferentes. En particular, el dispositivo 10 tiene cuatro módulos ópticos 16 que excitan diferentes regiones del disco rotatorio 13 en cualquier momento dado y recogen la energía luminosa fluorescente emitida a diferentes longitudes de onda por los colorantes. Como resultado, los módulos ópticos 16 se usan para estudiar múltiples reacciones paralelas que se producen en la muestra 22.

35 Las múltiples reacciones se pueden producir, por ejemplo, simultáneamente en una cámara individual del disco rotatorio 13. Cada uno de los módulos ópticos 16 estudia la muestra 22 y recoge la energía luminosa fluorescente a diferentes longitudes de onda a medida que el disco 13 rota. Por ejemplo, las fuentes de excitación en los módulos 16 se pueden activar secuencialmente durante periodos suficientes para recoger los datos a las correspondientes longitudes de onda. Es decir, un módulo óptico 16A se puede activar durante un periodo de tiempo para recoger los datos en un primer intervalo de longitudes de onda elegidas para un primer colorante que corresponde con la primera reacción. La fuente de excitación puede ser entonces desactivada y se puede activar una fuente de excitación en el módulo 16B para estudiar la muestra 22 en un segundo intervalo de longitudes de onda elegidas para un segundo colorante que corresponde a una segunda reacción. Este procedimiento continúa hasta que se han recogido los datos de todos los módulos ópticos 16. En un modo de realización, cada una de las fuentes de excitación en los módulos ópticos 16 se activa durante un periodo inicial de aproximadamente dos segundos para alcanzar el estado estacionario seguido por un periodo de estudio que se prolonga durante 10-50 rotaciones del disco 13. En otros modos de realización, las fuentes de excitación pueden secuenciarse para periodos más cortos (por ejemplo, 1 ó 2 milisegundos) o más largos. En algunos modos de realización, se puede activar más de un módulo óptico simultáneamente para el estudio concurrente de la muestra 22 mientras el disco 13 rota.

Aunque se presenta una muestra 22 individual, el disco 13 contiene varias cámaras que portan muestras. Los módulos ópticos 16 estudian algunas o todas las cámaras diferentes a longitudes de onda diferentes. En un modo de

realización, el disco 13 incluye 96 cámaras espaciadas alrededor de la circunferencia del disco 13. Con un disco de 96 cámaras y cuatro módulos ópticos 16, el dispositivo 10 puede ser capaz de adquirir datos de 384 especies diferentes.

5 En un modo de realización, los módulos ópticos 16 incluyen fuentes de excitación que son diodos emisores de luz baratos (LED) de alta potencia, que están comercialmente disponibles en una variedad de longitudes de onda y tienen una larga vida útil (por ejemplo, 100,000 horas o más). En otro modo de realización, se pueden utilizar lámparas halógenas convencionales o lámparas de mercurio como fuentes de excitación.

10 Como se muestra en la FIGURA 1, cada uno de los módulos ópticos 16 está acoplado con un brazo de un haz de fibras ópticas 14. El haz de fibras ópticas 14 proporciona un mecanismo flexible para recoger las señales fluorescentes de los módulos ópticos 16 sin perder sensibilidad. En general, un haz de fibras ópticas comprende múltiples fibras ópticas colocadas una al lado de otra y unidas en los extremos y recubiertas por una camisa protectora flexible. Alternativamente, el haz de fibras ópticas 14 puede comprender un número más pequeño de fibras multimodo discretas de gran diámetro, bien de vidrio o bien de plástico, que tienen un extremo común. Por ejemplo, para un dispositivo con cuatro módulos ópticos, el haz de fibras ópticas 16 puede comprender cuatro fibras multimodo discretas, teniendo cada una de ellas un diámetro interior de 1 mm. El extremo común del haz contiene las cuatro fibras unidas. En este ejemplo, la abertura del detector 18 puede ser de 8 mm que más que suficiente para acoplar las cuatro fibras.

15 En este ejemplo, el haz de fibras ópticas 14 acopla los módulos ópticos 16 con un único detector 18. Las fibras ópticas llevan la luz fluorescente recogida por los módulos ópticos 16 y suministran de forma eficaz la luz capturada al detector 18. En un modo de realización, el detector 18 es un tubo fotomultiplicador. En otros modos de realización se pueden usar uno o más detectores de estado sólido.

20 El uso de un único detector 18 es ventajoso en cuanto que permite usar un detector muy sensible y posiblemente caro (por ejemplo, un fotomultiplicador) manteniendo a la vez un coste mínimo ya que solo es necesario usar un único detector. En la presente memoria se describe un único detector; sin embargo, se puede incluir uno o más detectores para detectar un mayor número de colorantes. Por ejemplo, se pueden añadir cuatro módulos ópticos 16 y un segundo detector al sistema para permitir la detección de ocho diferentes longitudes de onda emitidas por un disco.

25 Los módulos ópticos 16 se pueden retirar del dispositivo y son fácilmente intercambiables con otros módulos ópticos que están optimizados para el estudio a diferentes longitudes de onda. Por ejemplo, los módulos ópticos 16 pueden montarse físicamente en posiciones de un alojamiento. Cada uno de los módulos ópticos 16 puede insertarse fácilmente en una posición respectiva del alojamiento a lo largo de unas guías (por ejemplo, ranuras empotradas) que se acoplan con una o más marcas (por ejemplo, ejes guía) del módulo óptico. Cada módulo óptico incluye una salida óptica (mostrada en la FIGURA 2) para acoplarse a un brazo del haz de fibras ópticas 14. La salida óptica tiene un extremo roscado acoplado a un conector roscado del brazo. Alternativamente, se puede usar una forma de "conexión rápida" (por ejemplo, una conexión deslizante que tiene una junta tórica y un pivote de arrastre) que permite que el haz de fibras ópticas 14 pueda ser conectado y desconectado mediante deslizamiento de la salida óptica. Además, cada uno de los módulos ópticos 16 puede tener uno o más contactos eléctricos para acoplar electrónicamente la unidad de control 23 cuando está totalmente insertada. Ejemplos de módulos ópticos desmontables para uso con el disco rotatorio 13 se describen en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 30 40 11/174.754, titulada "MULTIPLEX FLUORESCENCE DETECTION DEVICE HAVING REMOVABLE OPTICAL MODULES", presentada el 5 de julio de 2005.

45 La arquitectura modular del dispositivo 10 permite que el dispositivo se pueda adaptar fácilmente para todos los colorantes fluorescentes usados en un medio de análisis dado, tal como una PCR múltiple. Otros procesos químicos que se pueden usar en el dispositivo 10 incluyen Invader (Third Wave, Madison, Wisconsin), Transcripción mediada por amplificación (GenProbe, San Diego, California), análisis de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) marcadas por fluorescencia o hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La arquitectura modular del dispositivo 10 puede proporcionar otra ventaja en cuanto que la sensibilidad del módulo óptico 16 puede optimizarse eligiendo la correspondiente fuente de excitación (no mostrada) y filtros de excitación y de detección para un intervalo objetivo específico pequeño de longitudes de onda con el fin de excitar y detectar selectivamente un colorante correspondiente en una reacción múltiple.

50 A modo de ejemplo se ilustra el dispositivo 10 en una disposición múltiple de 4 colores, pero se pueden usar más o menos canales con el haz de fibras ópticas apropiado 14. Este diseño modular permite al usuario mejorar fácilmente el dispositivo 10 en el campo simplemente añadiendo otro módulo óptico 16 a la base 20 e insertando un brazo del haz de fibras ópticas 14 en el nuevo módulo óptico. Los módulos ópticos 16 pueden tener electrónica integrada que identifique los módulos ópticos y descargar los datos de calibración en un módulo óptico de control interno u otra electrónica interna (por ejemplo, la unidad de control 23) del dispositivo 10.

55 En el ejemplo de la FIGURA 1, las muestras 22 están contenidas en cámaras del disco 13 que están montadas sobre una plataforma rotatoria bajo el control de la unidad de control 23. Un activador 27 del sensor de ranura

proporciona una señal de salida usada por la unidad de control 23 y la adquisición de datos para sincronizar la adquisición de los datos con la posición de la cámara durante la rotación del disco. El activador 27 del sensor de ranura puede ser un sensor mecánico u óptico. Por ejemplo, el sensor puede ser un láser que envía un haz de luz al disco 13, y la unidad de control 23 utiliza un sensor que detecta la luz que pasa a través de una ranura en el disco 13 para ubicar las cámaras en el disco. Los módulos ópticos 16 se pueden montar físicamente por encima de la plataforma 25. Como resultado, los módulos ópticos 16 se superponen con las diferentes cámaras en cualquier momento.

El dispositivo de detección 10 también incluye un elemento calefactor (no mostrado) para modular la temperatura de la muestra 22 en el disco 13. El elemento calefactor puede comprender una lámpara halógena cilíndrica contenida en un espacio reflectante. La cámara reflectante tiene una forma adecuada para enfocar la radiación de la lámpara sobre la sección radial del disco 13. Generalmente, el área calentada del disco 13 parece un anillo a medida que el disco 13 gira. En este modo de realización, la forma del espacio reflectante puede ser una combinación de geometrías elípticas y esféricas que permiten un enfoque preciso. En otros modos de realización, el espacio reflectante puede tener una forma diferente o la lámpara puede irradiar un área mayor. En otros modos de realización, el espacio reflectante puede tener una forma adecuada para enfocar la radiación de la lámpara sobre un área individual del disco 13, tal como una cámara de procesamiento individual que contiene la muestra 22.

En algunos modos de realización, el elemento calefactor puede calentar el aire y forzar el aire caliente sobre una o más muestras para modular la temperatura. Adicionalmente, las muestras pueden ser calentadas directamente por el disco. En este caso, el elemento calefactor puede estar localizado en la plataforma 25 y térmicamente acoplado con el disco 13. Una resistencia eléctrica en el elemento calefactor puede calentar una región elegida del disco controlada por la unidad de control 23. Por ejemplo, una región puede contener una o más cámaras, posiblemente el disco completo. Un ejemplo de elemento calefactor para ser usado con el disco rotatorio 13 se describe en la solicitud de patente estadounidense N° de serie 11/174.691, titulada "HEATING ELEMENT FOR A ROTATING MULTIPLEX FLUORESCENCE DETECTION DEVICE," presentada el 5 de Julio de 2005.

Alternativamente, o adicionalmente, el dispositivo 10 también puede incluir un componente refrigerante (no mostrado). En el dispositivo 10 se incluye un ventilador para suministrar aire frío, es decir aire a temperatura ambiente, al disco 13. La refrigeración puede ser necesaria para modular la temperatura de la muestra de forma apropiada y almacenar las muestras después de que un experimento ha sido concluido. En otros modos de realización, el componente refrigerante puede incluir el acoplamiento térmico entre la plataforma 25 y el disco 13, ya que la plataforma 25 puede reducir su temperatura cuando sea necesario. Por ejemplo, algunas muestras biológicas se pueden almacenar a 4 grados Celsius para reducir la actividad enzimática o la desnaturalización de las proteínas.

El dispositivo de detección 10 también puede ser capaz de controlar las especies de reacción contenidas en una cámara de procesamiento. Por ejemplo, puede ser beneficioso cargar algunas especies en una cámara de procesamiento para generar una reacción y después añadir otras especies a la muestra una vez que la primera reacción ha terminado. Se puede añadir un sistema de válvula buscadora láser para controlar una válvula que separa una cámara contenedora interna de la cámara de procesamiento, controlando de esta forma la adición de las especies a la cámara durante la rotación del disco 13. Este sistema de válvula buscadora láser puede estar localizado en uno de los módulos ópticos 16 o separado de los módulos ópticos. Directamente por debajo del láser, bajo el disco 13, puede haber un sensor láser para posicionar el láser con respecto al disco 13.

En un modo de realización, el láser es un láser de infrarrojo cercano (NIR) con al menos dos ajustes de potencia. Con el ajuste de baja potencia, el sensor posicionador del láser puede indicar que el láser está en posición sobre la válvula de la cámara reconociendo la luz NIR a través de una ranura en el disco 13. Una vez que el láser esté en posición, la unidad de control 23 dirige el láser para que salga una ráfaga corta de alta potencia para calentar la válvula y abrirla. La válvula abierta puede permitir entonces que el espécimen fluido interior fluya desde la cámara interior hacia la cámara de procesamiento exterior y que se produzca una segunda reacción. En algunos modos de realización, el disco 13 puede contener varias válvulas para generar varias reacciones en secuencia. También se pueden usar más de un ajuste del láser y del sensor láser cuando se usan múltiples válvulas de cámara. Un ejemplo de sistema de control de válvula buscadora láser para usarlo con el disco rotatorio se describe en la solicitud de patente estadounidense N° de serie 11/174.957, titulada "VALVE CONTROL SYSTEM FOR A ROTATING MULTIPLEX FLUORESCENCE DETECTION DEVICE", presentada el 5 de Julio de 2005.

El sistema 21 de adquisición de datos puede recoger los datos del dispositivo 10 para cada colorante bien secuencialmente o bien en paralelo. En un modo de realización, el sistema 21 de adquisición de datos recoge los datos de los módulos ópticos 16 en secuencia y corrige la superposición espacial mediante un retraso del activador para cada uno de los módulos ópticos medido a partir del activador del sensor de ranura 27.

Una aplicación del dispositivo 10 es la PCR en tiempo real, pero las técnicas descritas en la presente memoria se pueden extender a otras plataformas que usan la detección de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. El dispositivo 10 puede combinar ciclos térmicos rápidos, usando el elemento calefactor, y microfluidos controlados por centrifugación para el aislamiento, amplificación y detección de ácidos nucleicos. Usando la detección de fluorescencia múltiple se pueden detectar varias especies diana y analizarlas en paralelo.

Para la PCR en tiempo real, se usa la fluorescencia para medir la cantidad de amplificación en una de tres técnicas generales. La primera técnica es el uso de un colorante, tal como Sybr Green (Molecular Probes, Eugene, Oregon), cuya fluorescencia aumenta al enlazarse con el ADN de doble cadena. La segunda técnica usa sondas marcadas por fluorescencia cuya fluorescencia cambia cuando se enlazan con la secuencia diana amplificada (sondas de hibridación, sondas de horquilla, etc.). Esta técnica es similar a la utilización del colorante enlazado al ADN de cadena doble pero es más específica porque la sonda se enlazarán solo a una cierta sección de la secuencia diana. La tercera técnica es el uso de sondas de hidrólisis (Taqman™, Applied BioSystems, Foster City California), en la que la actividad exonucleasa de la enzima polimerasa escinde una molécula de enfriamiento de la sonda durante la fase de extensión de la PCR, haciéndola que sea activa para la fluorescencia.

En cada uno de los enfoques, la fluorescencia es linealmente proporcional a la concentración diana amplificada. El sistema de adquisición de datos 21 mide una señal de salida del detector 18 (o alternativamente de forma opcional, muestreada y comunicada por la unidad de control 23) durante la reacción de PCR para observar la amplificación casi en tiempo real. En la PCR múltiple, las múltiples dianas están marcadas con diferentes colorantes que se miden independientemente. Hablando de forma general, cada colorante tendrá espectros de absorbancia y de emisión diferentes. Por esta razón, los módulos ópticos 16 pueden tener fuentes de excitación, lentes y filtros relacionados que se eligen ópticamente para el análisis de la muestra 22 a diferentes longitudes de onda.

Algunos ejemplos de técnicas o materiales de construcción adecuados que se pueden adaptar para ser usados en conexión con la presente invención pueden describirse en, por ejemplo, la patente estadounidense de titularidad compartida N° 6.734.401 titulada "ENHANCED SAMPLE PROCESSING DEVICES SYSTEMS AND METHODS" (Bedingham *et al.*) y en la publicación de solicitud de patente estadounidense N° US 2002/0064885 titulada "SAMPLE PROCESSING DEVICES." Otras construcciones de dispositivo que se pueden usar se pueden encontrar, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense provisional N° de Serie 60/214.508 presentada el 28 de Junio de 2000 y titulada "THERMAL PROCESSING DEVICES AND METHODS"; la solicitud de patente estadounidense provisional N° de Serie 60/214.642 presentada el 28 de Junio de 2000 y titulada "SAMPLE PROCESSING DEVICES, SYSTEMS AND METHODS"; la solicitud de patente estadounidense provisional N° de Serie 60/237.072 presentada el 2 de Octubre de 2000 y titulada "SAMPLE PROCESSING DEVICES, SYSTEMS AND METHODS"; la solicitud de patente estadounidense provisional N° de Serie 60/260.063 presentada el 6 de Enero de 2001 y titulada "SAMPLE PROCESSING DEVICES, SYSTEMS AND METHODS"; la solicitud de patente estadounidense provisional N° de Serie 60/284.637 presentada el 18 de Abril de 2001 y titulada "ENHANCED SAMPLE PROCESSING DEVICES, SYSTEMS AND METHODS"; y la publicación de patente estadounidense N° US 2002/0048533 titulada "SAMPLE PROCESSING DEVICES AND CARRIERS." Otras construcciones de dispositivos potenciales se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente estadounidense N° 6.627.159 titulada "CENTRIFUGAL FILLING OF SAMPLE PROCESSING DEVICES" (Bedingham *et al.*).

La FIGURA 2 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de módulo óptico 16A que puede corresponder con cualquiera de los módulos ópticos 16 de la FIGURA 1. En este ejemplo, el módulo óptico 16A contiene una fuente de excitación de alta energía, un LED 30, una lente colimadora 32, un filtro de excitación 34, un filtro dicróico 36, una lente de enfoque 38, un filtro de detección 40 y una lente 42 para enfocar la fluorescencia en la salida óptica 19 acoplada a un brazo del haz de fibras ópticas 14.

Consecuentemente, la luz de excitación del LED 30 es colimada por la lente colimadora 32, filtrada por el filtro de excitación 34, transmitida a través del filtro dicróico 36 y enfocada en la muestra 22 mediante la lente de enfoque 38. La fluorescencia resultante emitida por la muestra es recogida por la misma lente de enfoque 38, reflejada fuera del filtro dicróico 36 y filtrada por el filtro de detección 40 antes de ser enfocada en un brazo del haz de fibras ópticas 14 acoplado a la salida óptica 19. El haz de fibras ópticas 14 transfiere entonces la luz al detector.

El LED 30, la lente de colimación 32, el filtro de excitación 34, el filtro dicróico 36, la lente de enfoque 38, el filtro de detección 40 y la lente 42 se eligen en función de las bandas de absorción y de emisión específicas de los múltiples colorantes con los que se va a usar el módulo óptico 16A. De esta forma, los módulos ópticos 16 pueden ser configurados y cargados en el dispositivo 10 para centrarse en diferentes colorantes.

La Tabla 1 lista ejemplos de componentes que se pueden usar en un dispositivo 10 de detección de fluorescencia múltiple de 4 canales para una pluralidad de colorantes fluorescentes. FAM, HEX, JOE, VIC, TET, ROX son marcas registradas de Applera, Norwalk, California. Tamra es una marca registrada de AnaSpec, San Jose, California. Texas Red es una marca registrada de Molecular Probes. Cy 5 es una marca registrada de Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido.

TABLA 1

Módulo óptico	LED	Filtro de excitación	Filtro de detección	Colorante
1	Azul	475 nm	520 nm	FAM, Sybr Green
2	Verde	530 nm	555 nm	HEX, JOE, VIC, TET
3	Naranja	580 nm	610 nm	TAMRA, ROX, Texas Red
4	Rojo	630 nm	670 nm	Cy 5

5 Una ventaja de la arquitectura de detección múltiple modular descrita es la flexibilidad para optimizar la detección para una amplia variedad de colorantes. Posiblemente, un usuario puede tener un banco con varios módulos ópticos diferentes que pueden ser conectados con el dispositivo 10 a medida que sea necesario, de los que N pueden ser usados en cualquier momento, donde N es el número máximo de canales soportados por el dispositivo. Por lo tanto, el dispositivo 10 y los módulos ópticos 16 pueden ser usados con cualquier colorante fluorescente y cualquier método de detección por PCR. Se puede usar un haz de fibras ópticas mayor para soportar un mayor número de canales de detección. Además, se pueden usar múltiples haces de fibras ópticas con múltiples detectores. Por ejemplo, se pueden usar haces de fibras ópticas de 4 brazos con ocho módulos ópticos 16 y dos detectores 18.

10 La FIGURA 3 es un diagrama de bloques funcionales del dispositivo 10 de detección de fluorescencia múltiple. En particular, la FIGURA 3 muestra las conexiones eléctricas entre los componentes del dispositivo y los caminos generales de la luz a través de los componentes. En el ejemplo de la FIGURA 3, el dispositivo 10 incluye por lo menos un procesador 44 u otra lógica de control, una memoria 46, el motor 48 del disco, la fuente de luz 30, el filtro de excitación 34, la lente 38, el filtro de detección 40, la lente de adquisición 42, el detector 18, el activador del sensor de ranura 27, la interfaz de comunicación 50, el elemento calefactor 54, el láser 55 y una fuente de alimentación 52. Como se muestra en la FIGURA 3, no es necesario que la lente 38 y la lente de adquisición 42 estén conectadas eléctricamente con ningún otro componente. Además, la fuente de luz 30, los filtros 34 y 40, la lente 38 y la lente de adquisición 42 son representativas de un módulo óptico. Aunque no se muestra en la FIGURA 3, el dispositivo 10 puede contener módulos ópticos 16 adicionales, como se ha descrito previamente. En dicho caso, cada módulo óptico adicional puede incluir componentes dispuestos esencialmente de forma similar a los que se han mostrado en la FIGURA 3.

15 La luz sigue un cierto camino a través de varios componentes en la FIGURA 3. Una vez que la luz es emitida por la fuente de luz 30, pasa por el filtro de excitación 34 y sale como luz de una longitud de onda discreta. A continuación pasa a través de la lente 38 en la que deja el dispositivo de detección 10 y excita la muestra 22 en una cámara de procesamiento (no mostrada). La muestra 22 responde emitiendo fluorescencia a una longitud de onda diferente, momento en el que esta luz pasa por la lente 38 y es filtrada por el filtro de detección 40. El filtro 40 elimina la luz de fondo de longitudes de onda diferentes de la fluorescencia deseada de la muestra 22. La luz restante es enviada a través de la lente de adquisición 42 y entra en un brazo del haz de fibras ópticas 14 antes de ser detectada por el detector. El detector 18 amplifica subsiguientemente la señal luminosa recibida.

20 El procesador 44, la memoria 46 y la interfaz de comunicación 50 pueden formar parte de la unidad de control 23. El procesador 44 controla el motor 48 del disco para que rote o gire el disco 13 a medida que sea necesario para recoger la información de la fluorescencia o mover el fluido a través del disco 13. El procesador 44 puede usar la información de la posición del disco recibida del activador del sensor de ranura 27 para identificar la posición de las cámaras en el disco 13 durante la rotación y sincronizar la adquisición de los datos de fluorescencia recibidos del disco.

25 El procesador 44 también puede controlar si la fuente de luz 30 en el módulo óptico 16 está encendida o apagada. En algunos modos de realización, el procesador 44 controla el filtro de excitación 34 y el filtro de detección 40. Dependiendo de la muestra que está siendo iluminada, el procesador 44 puede cambiar el filtro para permitir que diferentes longitudes de onda de la luz de excitación alcancen la muestra o que una longitud de onda diferente de la fluorescencia alcance la lente de adquisición 42. En algunos modos de realización, uno o ambos filtros pueden ser optimizados por la fuente de luz 30 del módulo óptico 16 particular y no pueden ser cambiados por el procesador 44.

30 La lente de adquisición 42 está acoplada con un brazo del haz de fibras 14 que proporciona un camino óptico para la luz de la lente de adquisición al detector 18. El procesador 44 puede controlar la operación del detector 18. Mientras que el detector 18 puede estar constantemente detectando toda la luz, algunos modos de realización pueden utilizar otros modos de adquisición. El procesador 44 puede determinar si el detector 18 recoge los datos y puede programar otros parámetros de configuración del detector 18. En un modo de realización, el detector 18 es un tubo

fotomultiplicador que captura la fluorescencia de la luz proporcionada por la lente de adquisición 42. En respuesta, el detector 18 produce una señal de salida 43 (por ejemplo, una señal de salida analógica) representativa de la luz recibida. Aunque no se muestra en la FIGURA 3, el detector 18 recibe conjuntamente luz de otros módulos ópticos 16 del dispositivo 10. En este caso, la señal de salida 19 representa eléctricamente una combinación de la entrada óptica recibida por el detector 18 de varios módulos ópticos 16.

El procesador 44 también puede controlar el flujo de datos del dispositivo 10. Datos tales como la fluorescencia muestreada por el detector 18, la temperatura de las muestras del elemento calefactor 54 y los sensores relacionados, y la información de la rotación del disco pueden ser almacenados en la memoria 46 para el análisis. El procesador 44 puede comprender uno o más cualesquiera de un microprocesador, un procesador de señal digital (DSP), un circuito integrado específico de aplicación (FPGA) y otro circuito lógico digital. Además, el procesador 44 proporciona un medio de operación para soportes lógicos inalterables, software o sus combinaciones, almacenados en un medio que pueda ser leído por ordenador, tal como una memoria 46.

La memoria 46 puede incluir una o más memorias para almacenar diversa información. Por ejemplo, una memoria puede contener parámetros de configuración específicos, instrucciones ejecutables, y otra puede contener los datos recogidos. Por lo tanto, el procesador 44 puede utilizar los datos almacenados en la memoria 46 para controlar la calibración y el funcionamiento del dispositivo. La memoria 46 puede incluir una o más de entre una memoria de acceso aleatorio (RAM), memoria de sólo lectura (ROM) ROM programable y que se puede borrar electrónicamente (EEPROM), memoria flash o similares.

El procesador 44 puede controlar además el elemento calefactor 54. Basándose en las instrucciones contenidas en la memoria 46, el elemento calefactor 54 puede ser controlado selectivamente para controlar la temperatura de una o más cámaras según los perfiles de calentamiento deseados. Generalmente, el elemento calefactor calienta una sección radial del disco 13 a medida que el disco gira. El elemento calefactor 54 puede comprender una lámpara halógena y un reflector para enfocar la energía de calentamiento sobre un área específica del disco 13. En otros modos de realización, el elemento calefactor 54 puede calentar una o más cámaras secuencialmente. Este modo de realización requeriría que el disco 13 permaneciera estacionario mientras que se calienta la cámara. En cualquier modo de realización, el elemento calefactor 54 puede ser capaz de encenderse y apagarse de forma extremadamente rápida a medida que sea necesario.

El láser 55 se usa para controlar la apertura de la válvula que permite que los contenidos de una cámara interna fluyan a otra cámara del disco 13, por ejemplo una cámara de procesamiento. El procesador 44 y el equipo de soporte físico controlan el láser 55 para abrir selectivamente las válvulas específicas contenidas en el disco 13. El procesador 44 puede interactuar con un sensor láser debajo del disco 13 para determinar la posición del láser con respecto a la válvula deseada. Cuando está en posición, el procesador 44 saca una señal para dirigir el láser 55 para producir una ráfaga de energía orientada a la válvula. En algunos casos, la ráfaga puede durar durante aproximadamente 0,5 segundos, mientras que en otros modos de realización puede incluir tiempos de apertura de duración mayor o menor. La energía del láser y la duración del pulso pueden estar controladas por el procesador 44 mediante la comunicación con el láser 55.

El procesador 44 usa la interfaz de comunicación 50 para comunicarse con el sistema de adquisición de datos 21. La interfaz de comunicación 50 puede incluir un único método o una combinación de métodos para transferir los datos. Algunos métodos pueden incluir un puerto de bus serial universal (USB) o un puerto IEEE 1394 para la conectividad con el equipo con velocidades de transferencia de datos muy grandes. En algunos modos de realización, un dispositivo de almacenamiento puede estar unido directamente a uno de estos puertos para el almacenamiento de datos y procesamiento posterior. Los datos pueden ser procesados previamente por el procesador 44 y dispuestos para visualizarlos, o puede ser necesario que los datos en bruto sean completamente procesados antes de que pueda iniciarse el análisis.

Las comunicaciones con el dispositivo de detección 10 también se pueden realizar por comunicación por frecuencia de radio (RF) o conexión por red de área local (LAN). Además, la conectividad se puede obtener por conexión directa o a través de un punto de acceso de red, tal como un nodo o un direccionador que pueden soportar comunicaciones con o sin cables. Por ejemplo, el dispositivo de detección 10 puede transmitir datos con una frecuencia RF determinada para su recepción por el dispositivo de adquisición de datos 21 objetivo. El dispositivo de adquisición de datos 21 puede ser un ordenador general, un ordenador portátil, un dispositivo manual de computación o un dispositivo de aplicación específica. Además, varios dispositivos de adquisición de datos pueden recibir los datos simultáneamente. En otros modos de realización, el dispositivo de adquisición de datos 21 puede estar incluido en el dispositivo de detección 10 como un sistema integrado de detección y adquisición.

Además, el dispositivo de detección 10 puede ser capaz de descargar soporte lógico actualizado, soporte lógico inalterable y datos de calibración de un dispositivo remoto a través de una red, tal como internet. La interfaz de comunicación 50 puede también permitir que el procesador 44 controle el informe de inventario de cualquier fallo. Si se produce un problema de operación, el procesador 44 puede ser capaz de sacar información de error para ayudar al usuario para resolver el problema proporcionándole datos de operación. Por ejemplo, el procesador 44 puede proporcionar información para ayudar al usuario a diagnosticar un elemento calefactor que falle o un problema de

sincronización.

La fuente de alimentación 52 suministra energía de operación a los componentes del dispositivo 10. La fuente de alimentación 52 puede usar electricidad de una salida eléctrica estándar de 115 voltios o incluir una batería y un circuito de generación de energía para producir la energía de operación. En algunos modos de realización, la batería puede ser recargable para permitir una operación extensa. Por ejemplo, el dispositivo 10 puede ser portátil para la detección de muestras biológicas en caso de emergencia, como una zona de desastre. La recarga puede ser realizada a través de una salida eléctrica de 115 voltios. En otros modos de realización, se pueden usar baterías tradicionales.

La FIGURA 4 es un diagrama de bloques funcional del detector individual 18 acoplado a cuatro fibras ópticas del haz de fibras ópticas. En este modo de realización el detector 18 es un tubo fotomultiplicador. Cada brazo del haz de fibras ópticas 14, la fibra óptica 14A, la fibra óptica 14B, la fibra óptica 14C y la fibra óptica 14D, se acopla con una interfaz de entrada óptica 55 del detector 18. De esta forma, la luz llevada por cualquiera de las fibras ópticas 14 es suministrada a una sola interfaz de entrada óptica 55 del detector 18. En algunas realizaciones, cada brazo del haz de fibra óptica 14 puede ser de un diámetro o longitud diferentes o ambas cosas. Por ejemplo, la fibra óptica 14A puede ser de mayor diámetro para transmitir más luz al detector 18 que las otras fibras ópticas de fibra óptica 14. La interfaz de entrada óptica 55 proporciona la luz total al electromultiplicador 56. El ánodo 58 recoge los electrones y produce la correspondiente señal analógica con señal de salida.

En otras palabras, como se muestra, las fibras ópticas 14 se ajustan en la apertura óptica de entrada del detector 18. Por consiguiente, el detector 18 se usa para detectar luz de cada brazo del haz de fibras ópticas 14 simultáneamente. La interfaz de entrada óptica 55 proporciona la luz al electromultiplicador 56. Para un tubo fotomultiplicador, los fotones de las fibras ópticas impactan en primer lugar en un cátodo fotosensible que a su vez libera fotoelectrones. A continuación, los fotoelectrones crean una cascada impactando en una serie de dinodos emitiéndose más fotoelectrones por contacto con cada dinodo. El grupo resultante de electrones multiplican esencialmente las pequeñas señales luminosas transmitidas originalmente por las fibras ópticas 14. El número de electrones aumentado se recoge finalmente por el ánodo 58. Esta corriente del ánodo 58 se transfiere mediante una corriente al amplificador de voltaje 59 como una señal de salida analógica que es representativa de las señales ópticas de fluorescencia de la muestra proporcionada por la pluralidad de los módulos ópticos 16.

El módulo óptico de control 23 incluye un convertidor analógico a digital (A/D) 60 que convierte la señal analógica en una corriente de datos digitales muestreados, es decir, una señal digital. El procesador 44 recibe la señal digital y almacena los datos muestreados en la memoria 46 para comunicación de los datos al dispositivo de adquisición 21, como se ha descrito anteriormente. En algunos modos de realización, el convertidor A/D 60 puede estar contenido en el detector 18 en lugar de en el módulo de control óptico 23.

De esta forma, un único detector 18 se utiliza para recoger toda la luz del haz óptico 14 y producir una señal representativa de ella. Una vez que la señal es amplificada por el amplificador 59 y convertida en una señal digital, puede ser separada digitalmente en datos que corresponden a la luz recogida por cada uno de los módulos ópticos 16 individuales. La señal total (es decir agregada) puede ser separada por intervalos de frecuencia en cada una de las señales detectadas representativas de cada fluorescencia. Estas frecuencias pueden ser separadas por un filtro digital aplicado por el dispositivo de adquisición de datos 21 o en el dispositivo 10.

En otros modos de realización, la señal amplificada puede ser separada por frecuencias usando filtros analógicos y ser enviada a canales separados antes del convertidor A/D 60. A continuación, cada canal puede ser digitalizado separadamente y enviado al dispositivo de adquisición de datos. En ambos casos, el detector individual es capaz de capturar toda la información de la fluorescencia de cada módulo óptico 16. El dispositivo 21 de adquisición de datos puede entonces representar y analizar la señal adquirida de cada cámara del disco 13 en tiempo real sin necesidad de detectores múltiples.

En algunos modos de realización, el detector 18 puede no ser un tubo fotomultiplicador. En general, el detector 18 puede ser cualquier tipo de dispositivo de detección analógico o digital capaz de capturar luz de varios brazos de un mecanismo de suministro óptico, es decir el haz de fibras 14, y producir una representación que se pueda transmitir de la luz capturada. Otros modos de realización pueden incluir un detector que es un fototransistor o un fotodiodo amplificado.

La FIGURA 5 es un diagrama de flujo que ilustra la operación del dispositivo 10 de detección de fluorescencia múltiple. Inicialmente, un operador especifica los parámetros del programa en el dispositivo de adquisición de datos 21 o a través de una interfaz con la unidad de control 23 (62). Por ejemplo, estos parámetros pueden incluir una velocidad y un periodo de tiempo para rotar el disco 13, definir los perfiles de temperatura para la reacción y las posiciones de la muestra en el disco 13.

A continuación, el usuario carga el disco 13 en el dispositivo de detección 10 (64). Después de asegurar el dispositivo 10, el usuario inicia el programa (66) haciendo que la unidad de control 23 comience a girar el disco (68) a una velocidad especificada. Después de que el disco comience a girar, pueden ocurrir dos procesos concurrentes.

- En primer lugar, el dispositivo de detección 10 comienza a detectar fluorescencia de la luz de excitación (70) producida por una o más reacciones en una o más muestras. El detector 18 amplifica las señales de fluorescencia de cada muestra que están sincronizadas con cada muestra respectiva y el tiempo al que se emitió la fluorescencia (72). Durante este proceso, el procesador 44 guarda los datos capturados en la memoria 46 y puede comunicar los datos al dispositivo de adquisición de datos 10 en tiempo real para controlar el progreso del análisis y para procesamientos adicionales (73). Alternativamente, el procesador 44 puede guardar los datos en el dispositivo 10 hasta que se complete el programa. El procesador 44 continúa detectando la fluorescencia de la muestra y salva los datos hasta que el programa finaliza (74). Una vez que se ha completado la ejecución, la unidad de control 23 detiene el giro del disco (76).
- 10 Durante este proceso, la unidad 23 controla la temperatura del disco (78) y modula la temperatura del disco, o de cada muestra, para obtener la temperatura objetivo para cada tiempo (80). La unidad de control 23 sigue monitorizando y controlando las temperaturas hasta que el programa finaliza (82). Una vez que se ha completado la ejecución, la unidad de control 23 mantiene la temperatura de las muestras a la temperatura de almacenamiento de las muestras, generalmente 4 grados Celsius (84).
- 15 La operación del dispositivo 10 puede variar del ejemplo de la FIGURA 5. Por ejemplo, las revoluciones por minuto del disco se pueden modificar mediante el programa y el láser 55 puede ser utilizado para abrir las válvulas entre las cámaras del disco para permitir reacciones múltiples. Estas etapas pueden ocurrir en cualquier orden durante la operación, dependiendo del programa que el usuario defina.

Ejemplo

- 20 Las FIGURAS 6 y 7 muestran los espectros de absorción y de emisión de colorantes usados generalmente que pueden ser utilizados con el dispositivo 10 en la PCR múltiple. En estos ejemplos, los máximos de absorción de los colorantes varían de 480-620 nm y los máximos de emisión resultantes varían de 520-670 nm. Las señales para cada colorante en la FIGURA 6 se numeran como FAM 88, Sybr 90, JOE 92, TET 94, HEX 96, ROX 98, Tx Red 100 y Cy5 102. Las señales en la FIGURA 7 son FAM 104, Sybr 106, TET 108, JOE 110, HEX 112, ROX 114, Tx Red 116 y Cy5 118. FAM, HEX, JOE, VIC, TET, ROX son marcas registradas de Applied Biosystems, Foster City, California. Tamra es una marca registrada de AnaSpec, San Jose, California. Texas Red es una marca registrada de Molecular Probes. Cy 5 es una marca registrada de Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido.

- En un ejemplo, un disco de 96 cámaras se rellenó con diferentes concentraciones de los colorantes FAM y ROX diluidos en disolución tampón de reacción de PCR estándar. Se añadieron cuatro réplicas de cada colorante en una serie de diluciones 2x, empezando con FAM 200nM y ROX 2000nM. El volumen de cada muestra fue de 10 µL. La cámara 82 tenía una mezcla de 5 µL de FAM 200nM y 5 µL de ROX nM. El dispositivo 10 se construyó como un dispositivo de detección de PCR múltiple de dos canales que tenía dos módulos ópticos 16 para la detección de los colorantes.

- 30 El primer módulo óptico (el módulo óptico FAM) contenía un LED azul, un filtro de excitación a 475 nm y un filtro de detección a 520 nm. El segundo módulo óptico (el módulo óptico ROX) contenía un LED verde con un filtro de excitación a 560 nm y un filtro de detección a 610 nm. Otra opción sería incorporar un LED naranja y un filtro de excitación a 580 nm para optimizar la detección del ROX.

- Se realizó el análisis por PCR y las señales fluorescentes de las muestras se multiplexaron en un haz de fibras ópticas bifurcado. El haz de fibras se interconectó con un solo detector, específicamente un tubo fotomultiplicador (PMT). Se recogieron los datos en un panel de adquisición de datos (DAQ) de National Instruments con una interfaz con un programa de adquisición de datos Visual Basic ejecutado en un ordenador de uso general. Los datos se recogieron mientras los discos giraban a 1.000 revoluciones por minuto (nominalmente). Se usaron secuencialmente el módulo óptico FAM y el módulo óptico ROX para estudiar las muestras. Cada barrido consistía en una media de 50 rotaciones. Los datos en bruto de los módulos ópticos se muestran en las FIGURAS 8A y 8B.

- 45 La gráfica de la FIGURA 8A se tomó encendiendo el LED en el módulo óptico FAM y la gráfica de la FIGURA 8B se tomó encendiendo el LED en el módulo óptico ROX.

- Durante el análisis, los datos recogidos mostraron claramente que había un desfase temporal asociado con los módulos ópticos que estaban localizados físicamente sobre diferentes cámaras en cualquier momento dado. Se calculó el valor del desfase determinando el desfase temporal entre los módulos ópticos 1 y 2 para una cámara particular, es decir, en este caso, la cámara 82. En otras palabras, el desfase temporal indica la cantidad de retraso temporal entre los datos obtenidos por el módulo óptico FAM y los datos obtenidos por el módulo óptico ROX para la misma cámara.

- La FIGURA 9 es un gráfico que muestra los datos integrados después de restar el desfase para cada cámara. El FAM está indicado por las barras marcadas con puntos, el ROX está indicado por las barras abiertas y los datos del ROX se sitúan sobre los datos del FAM. Los datos mostraron que no había señal del colorante ROX en el módulo óptico 1 y que no había señal del FAM en el módulo óptico 2. Había un ruido de fondo mayor en el módulo óptico 1 que fue corregido usando una serie de filtros optimizados. Se analizaron los datos para determinar el límite de

detección (LOD) descrito como la señal equivalente al nivel de ruido de la línea base. El nivel de ruido de la línea base fue definido como la media de diez barridos de una cámara en blanco más tres veces la desviación estándar.

5 El LOD se determinó mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados de la señal integrada representada frente a la concentración de los patrones de FAM y ROX. Se calculó que el LOD de los módulos ópticos de FAM y ROX eran 1 y 4nM, respectivamente, como se muestra en las FIGURAS 10A y 10B.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de detección que comprende:
un disco (13) que tiene una pluralidad de cámaras de proceso cada una para contener una muestra respectiva (22) y una pluralidad de colorantes fluorescentes;
- 5 un motor para rotar dicho disco;
una pluralidad de módulos ópticos (16), en los que cada uno de los módulos ópticos incluye una fuente de luz (30) seleccionada para excitar uno diferente de los colorantes y una lente (42) para capturar la luz fluorescente de diferentes longitudes de onda emitidas desde las cámaras de proceso del disco;
- 10 dichos módulos ópticos están configurados ópticamente para estudiar los colorantes fluorescentes a diferentes longitudes de onda;
un solo detector (18); y
un haz de fibras ópticas (14) acoplado con la pluralidad de módulos ópticos para transmitir simultáneamente la luz fluorescente desde los múltiples módulos ópticos al único detector;
- 15 2. El dispositivo de detección de la reivindicación 1, en el que cada uno de los módulos ópticos comprende además un filtro de excitación y un filtro de detección.
3. El dispositivo de detección de la reivindicación 1, en el que las fuentes de luz de los módulos ópticos comprenden diodos emisores de luz o diodos láser.
4. El dispositivo de detección de la reivindicación 1, en el que el dispositivo incluye por lo menos cuatro módulos ópticos.
- 20 5. Un sistema de detección que comprende,
un dispositivo de adquisición de datos; y
el dispositivo de detección según la reivindicación 1 acoplado con el dispositivo de adquisición de datos.
6. El sistema de la reivindicación 5, en el que el dispositivo de adquisición de datos calcula un desfase temporal entre los módulos ópticos y procesa los datos desde el dispositivo de detección basándose en el desfase temporal.
- 25 7. El sistema de la reivindicación 5, en el que cada uno de los módulos ópticos comprende además un filtro de excitación y un filtro de detección seleccionados para las longitudes de onda diferentes.
8. El dispositivo de detección de la reivindicación 1 o el sistema de la reivindicación 5, en el que el dispositivo de detección comprende además un activador del sensor de ranura que proporciona una señal de salida para la sincronización de la rotación del disco con los datos proporcionados por el detector.
- 30 9. El sistema de la reivindicación 8,
en el que cada módulo óptico puede montarse físicamente dentro de las posiciones respectivas del dispositivo, y
en el que cada módulo óptico se puede insertar dentro de la respectiva posición a lo largo de guías que coinciden con una o más marcas del módulo óptico.
- 35 10. El sistema según la reivindicación 9, en el que cada uno de los módulos ópticos incluye una salida óptica para acoplarse con un brazo del haz de fibras ópticas.
11. El sistema de la reivindicación 9, en el que cada módulo óptico tiene uno o más contactos eléctricos para acoplar eléctricamente una unidad electrónica de control cuando está totalmente insertada en el lugar.
- 40 12. El dispositivo de detección de la reivindicación 1 o el sistema de la reivindicación 5, en el que el haz de fibras ópticas incluye una pluralidad de brazos de fibra óptica que termina cada uno en la abertura del detector.
13. El dispositivo de detección de la reivindicación 1 o el sistema de la reivindicación 5, en el que el detector es un fotomultiplicador, un fotodiodo amplificado, un fotodiodo de avalancha o un fototransistor.
14. Un método que comprende:
rotar un disco que tiene una pluralidad de cámaras de procesamiento, cada una tiene una pluralidad de colorantes

fluorescentes que emiten luz fluorescente en longitudes de onda diferentes;

excitar el disco con una pluralidad de haces de luz simultáneamente para producir una pluralidad haces de luz fluorescente emitidos de diferentes longitudes de onda;

5 capturar los haces de luz fluorescente con una pluralidad de diferentes módulos ópticos, en el que los módulos ópticos están configurados ópticamente para estudiar los colorantes fluorescentes a diferentes longitudes de onda;

transmitir simultáneamente los haces de luz fluorescente desde la pluralidad de módulos ópticos de un único detector con un haz de fibras ópticas; y

emitir una señal desde el detector representativo de haces de luz detectada.

10 15. El método de la reivindicación 14, en el que la excitación del disco con una pluralidad de haces de luz se puede lograr mediante el envío de los haces de luz a través de un filtro de excitación y la captura de los haces de luz fluorescente se puede lograr mediante el envío de los haces de luz fluorescente a través de un filtro de detección.

16. El método de la reivindicación 14, que comprende además proporcionar una señal de salida desde un activador de sensor de ranura para la sincronización de la rotación del disco con los datos proporcionados por el detector.

15 17. El método de la reivindicación 14, en el que el único detector comprende un fotomultiplicador, un fotodiodo amplificado o un fototermistor.

18. El método de la reivindicación 14, en el que los haces de luz se producen y se capturan desde por lo menos cuatro módulos ópticos.

20 19. El método de la reivindicación 14, que comprende además seleccionar una longitud de onda para cada uno de la pluralidad de haces de luz para excitar las diferentes especies de una reacción en cadena de polimerasa (PCR) que utiliza detección de fluorescencia a múltiples longitudes de onda.

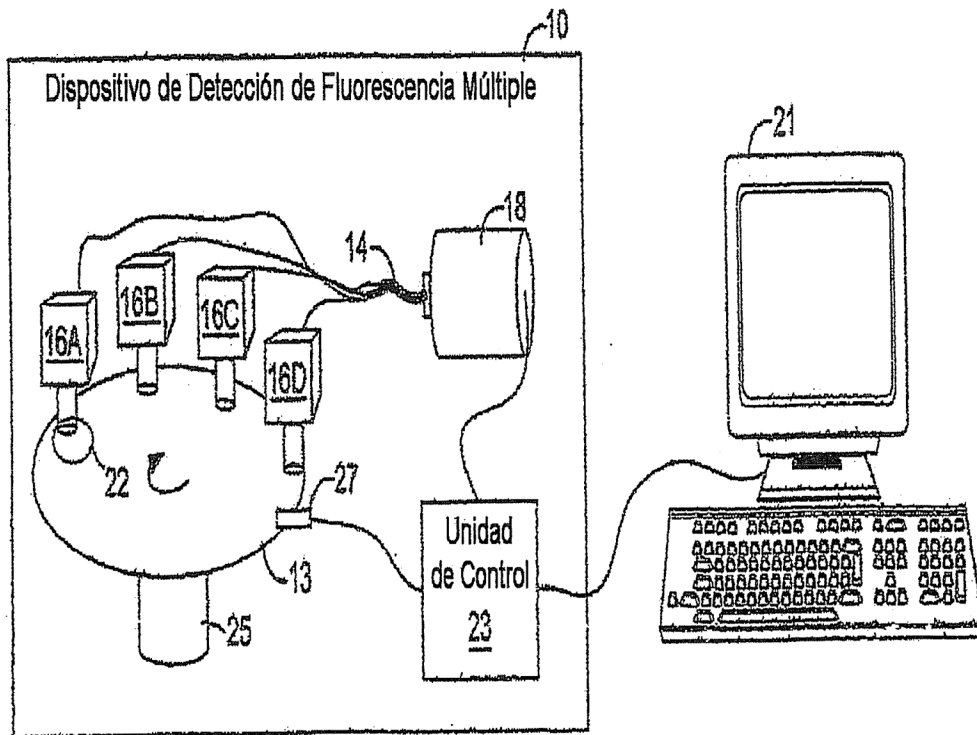


Fig. 1

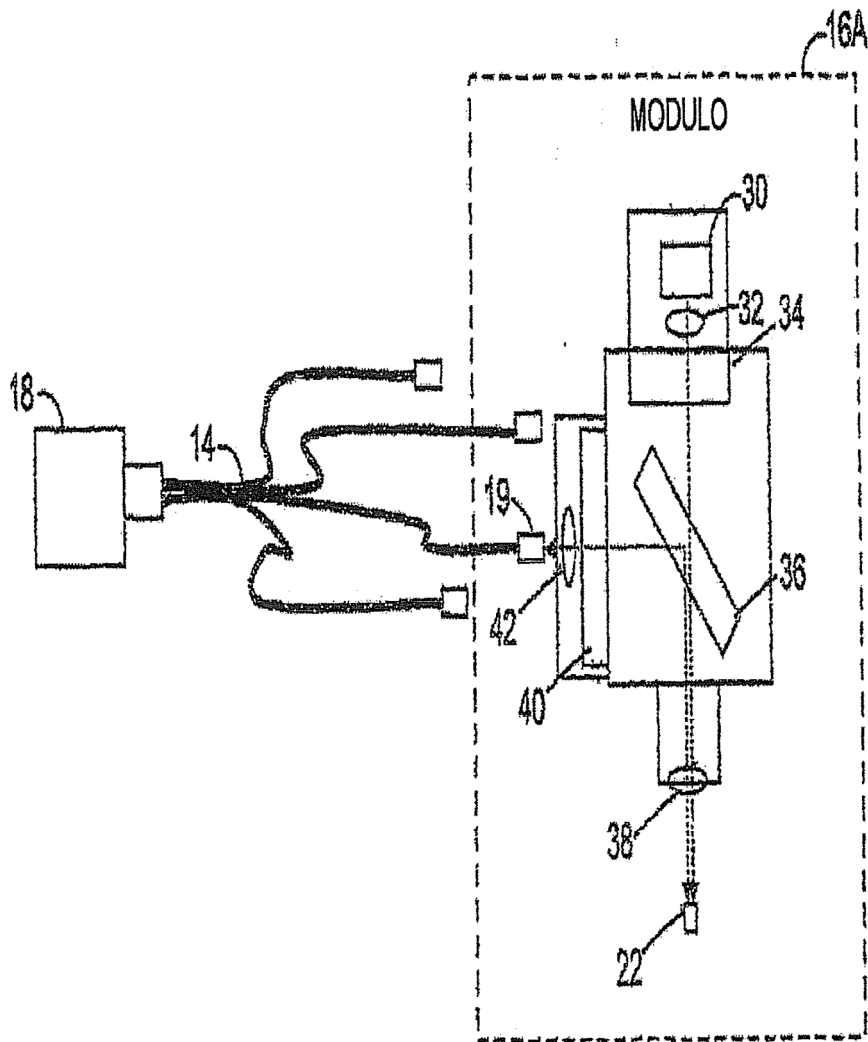


Fig. 2

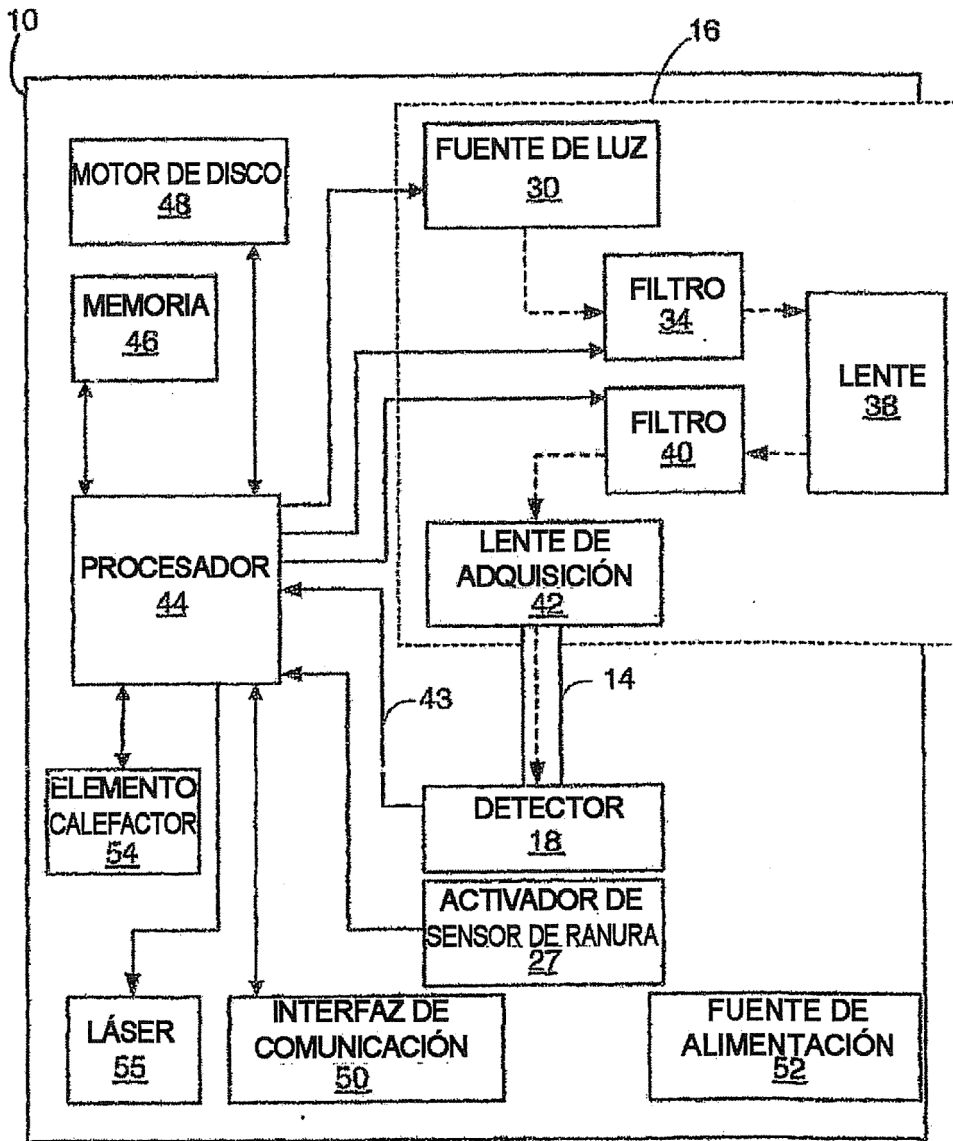


Fig. 3

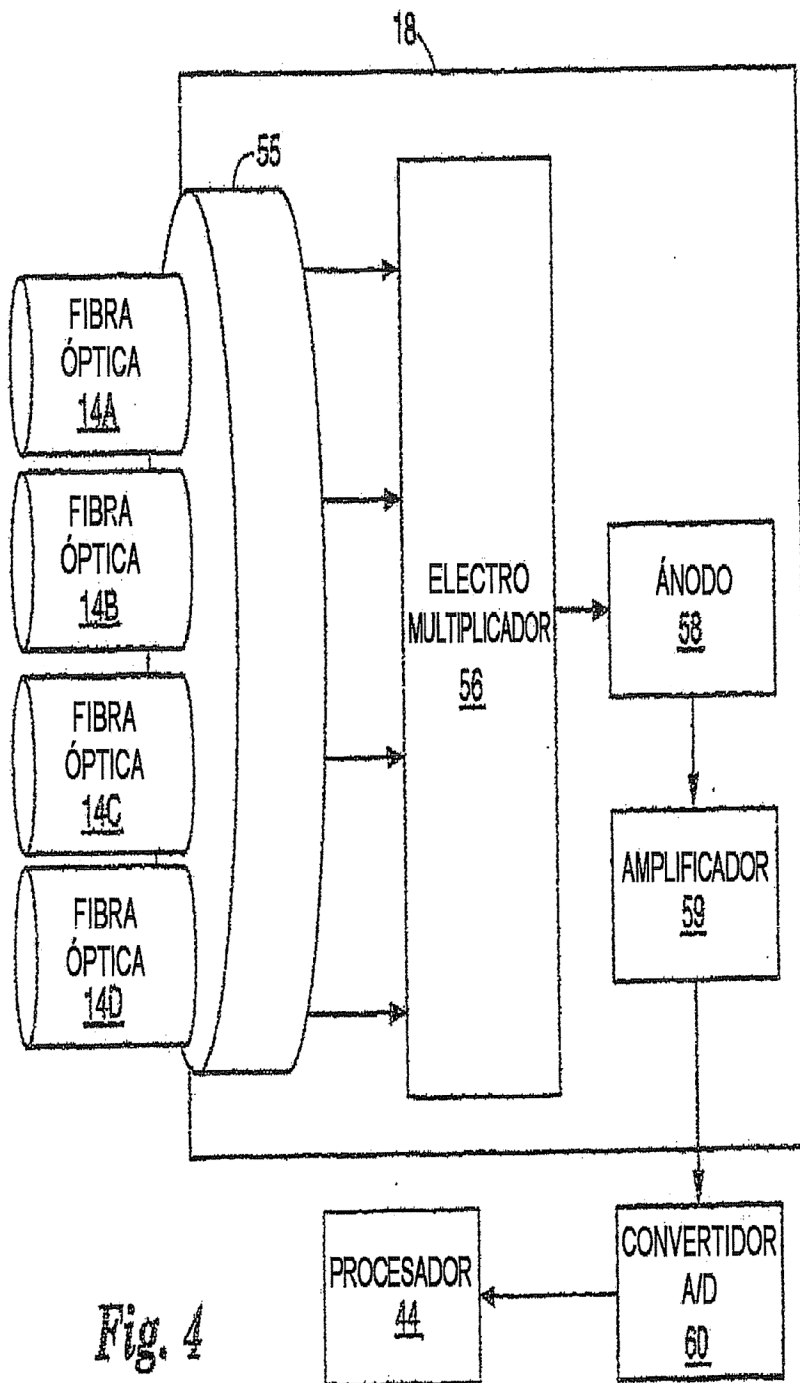


Fig. 4

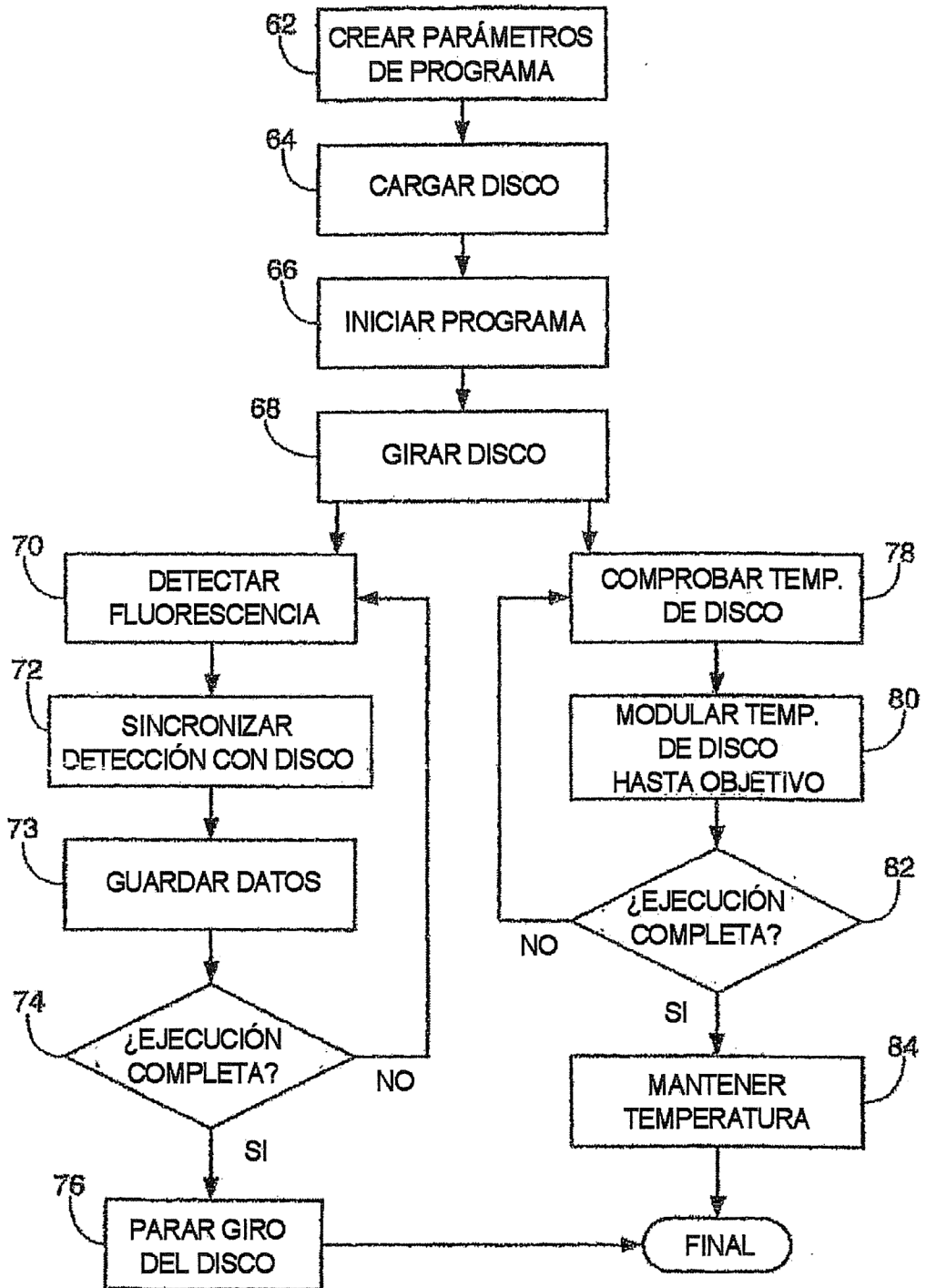


Fig. 5

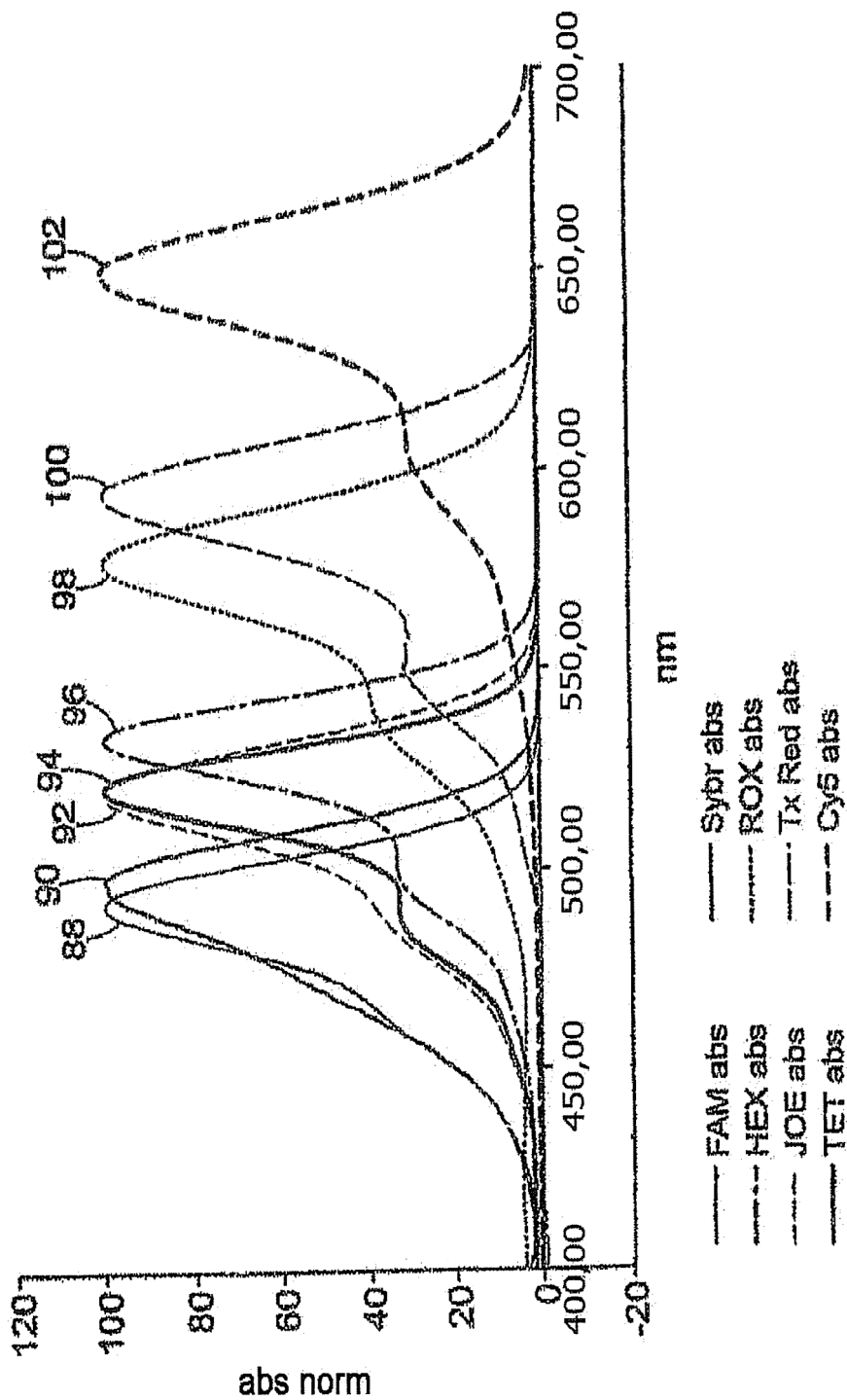


Fig. 6

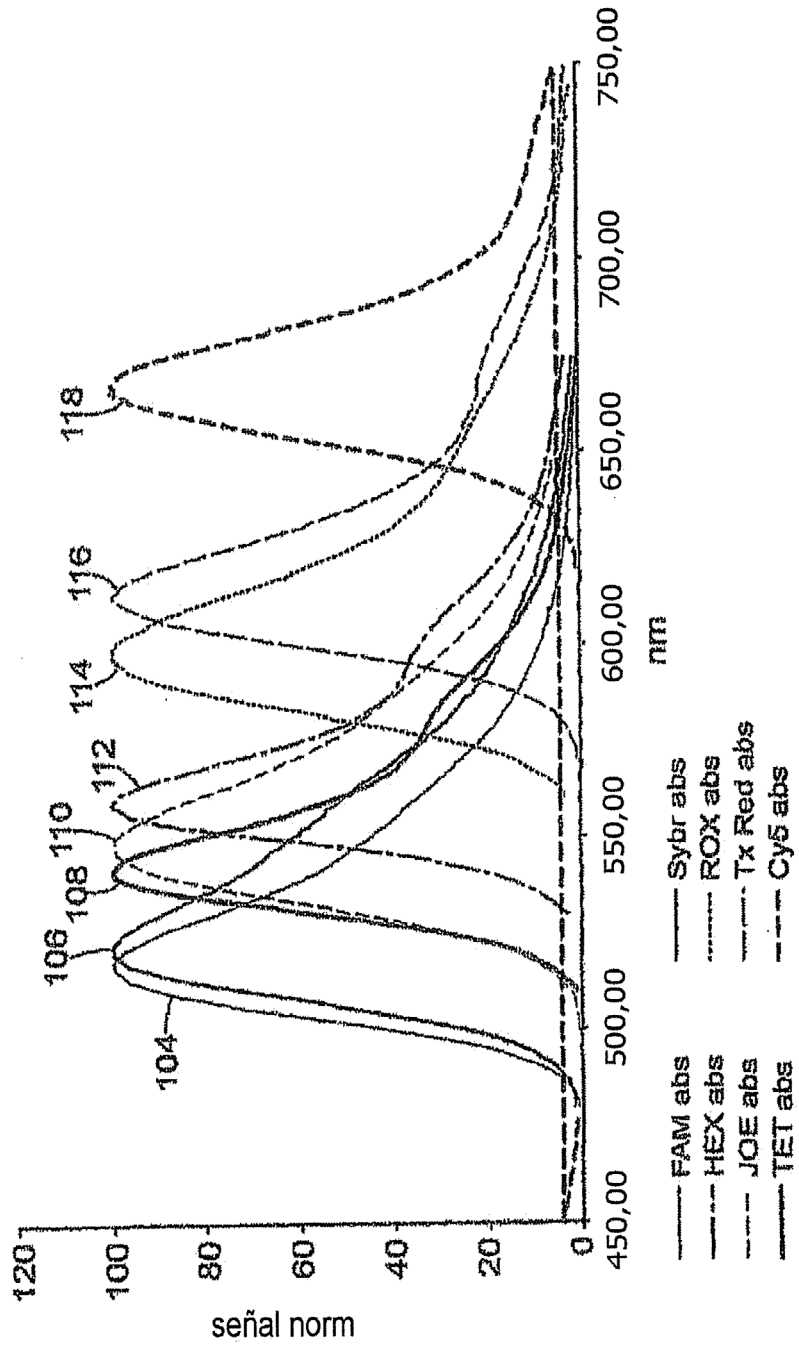


Fig. 7

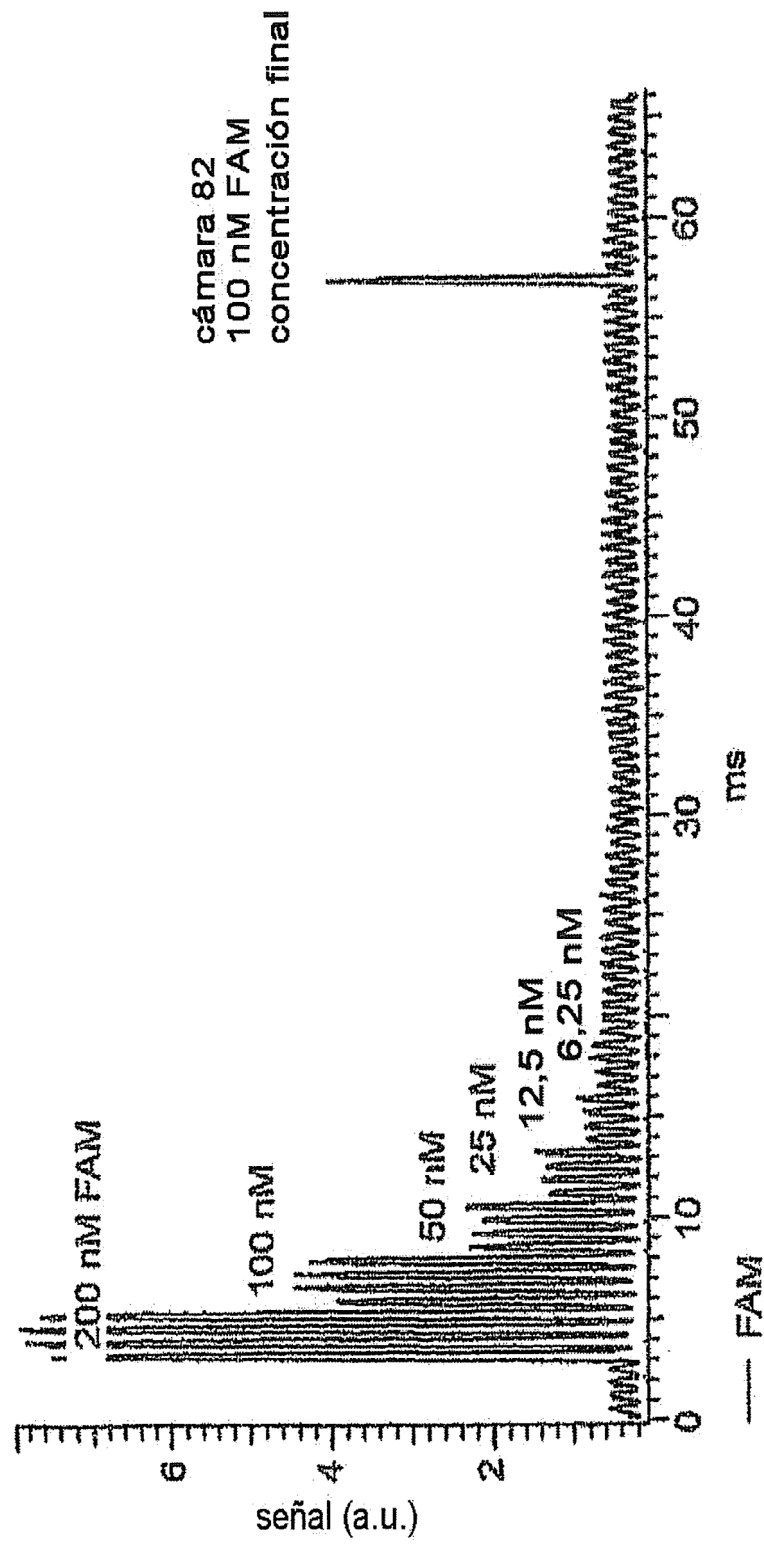


Fig. 8A

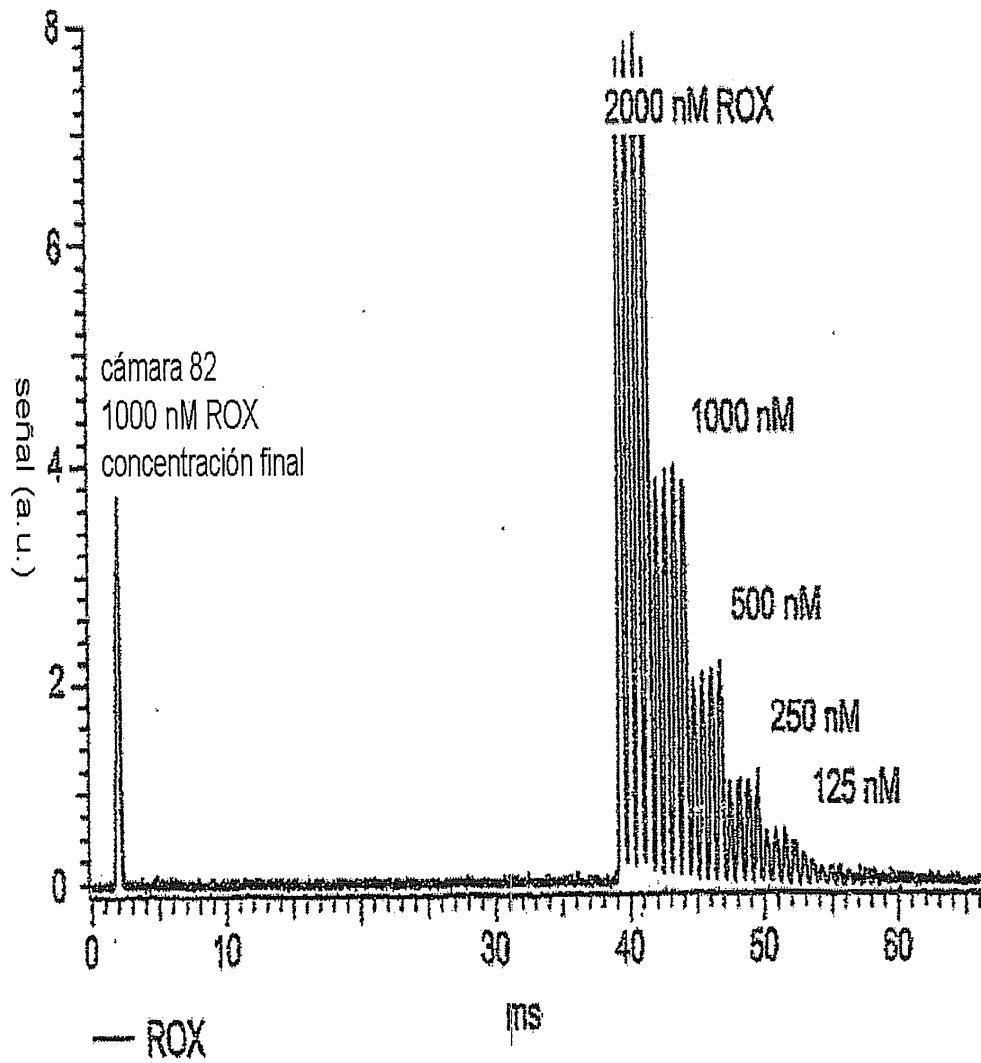


Fig. 8B

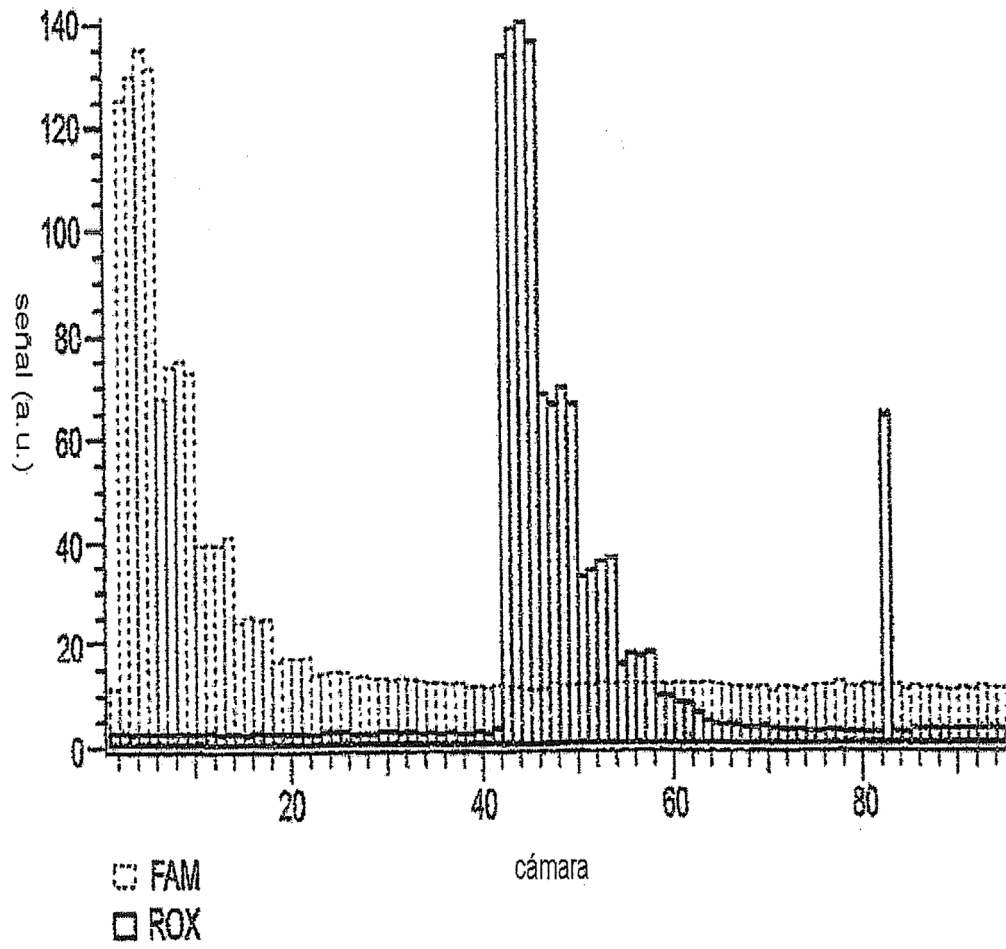


Fig. 9

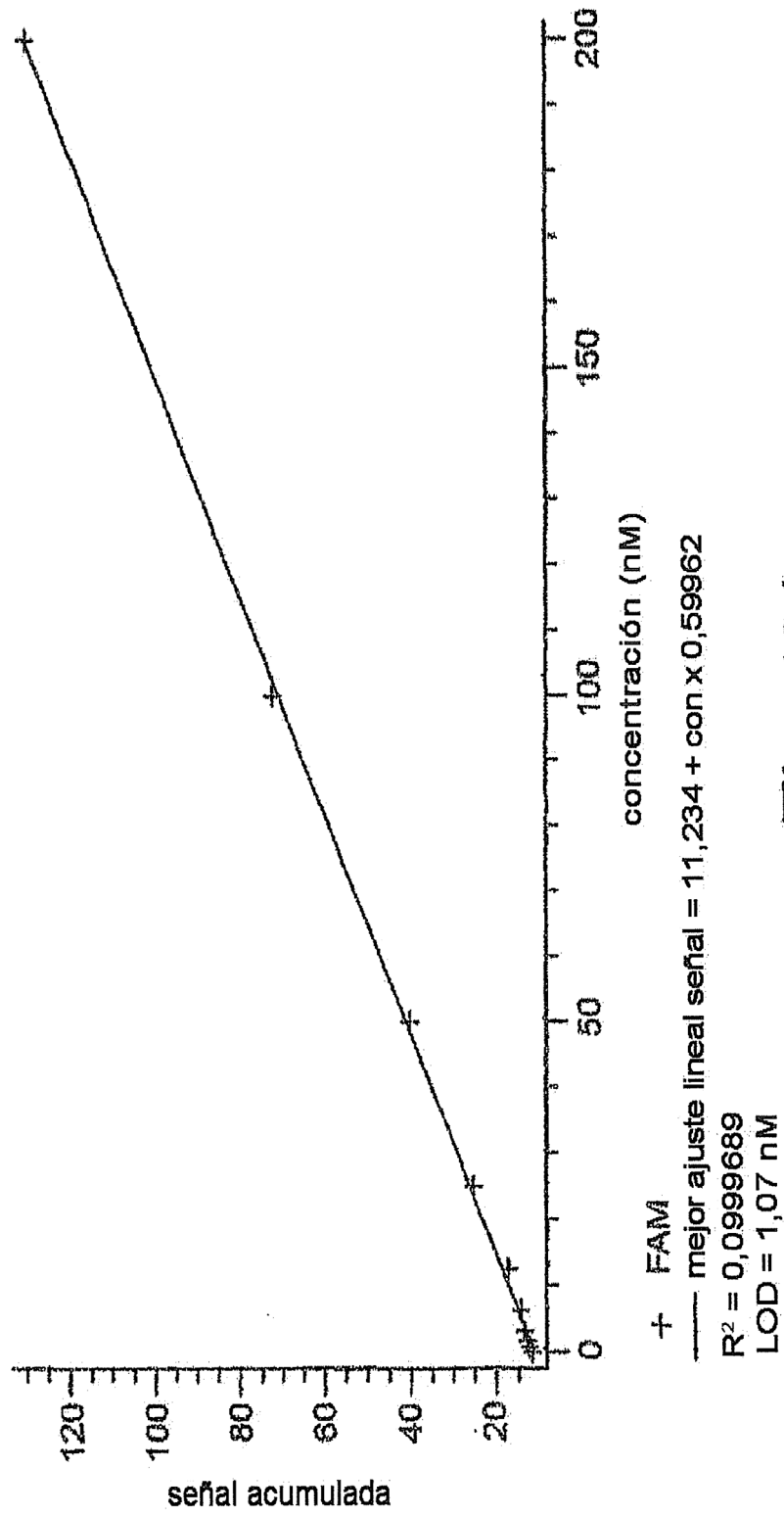


Fig. 10A

