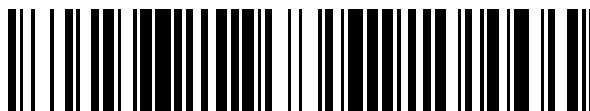


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 678**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08773727 .6**
96 Fecha de presentación: **27.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2160594**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2010**

54 Título: **SISTEMAS Y MÉTODOS PARA DETERMINAR LOS COEFICIENTES DE INTERFERENCIA EN LA PCR Y OTROS CONJUNTOS DE DATOS.**

30 Prioridad:
29.06.2007 US 947065 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2011

73 Titular/es:
**F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:
**KURNIK, Ronald, T.;
SANE, Aditya y
ELKIN, Chris**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 370 678 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

Sistemas y métodos para determinar los coeficientes de interferencia en la PCR y otros conjuntos de datos

5 Antecedentes de la invención

La presente invención está relacionada en general con los sistemas y métodos para procesar datos que representan curvas de tipo sigmoide o de crecimiento como las curvas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y más concretamente con los sistemas y métodos para determinar las características de interferencia de los sistemas de
10 detección de la PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método *in vitro* para sintetizar de forma enzimática o amplificar secuencias de ácidos nucleicos definidas. La reacción normalmente utiliza dos cebadores oligonucleótidos que hibridan sobre cadenas opuestas y que flanquean una secuencia de DNA molde o diana que se debe amplificar. La
15 elongación de los cebadores está catalizada por una polimerasa de DNA termoestable. Una serie repetitiva de ciclos que involucran la desnaturalización del molde, la hibridación de cebadores y la extensión de los cebadores hibridados por la polimerasa resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de DNA. Normalmente se utilizan las sondas fluorescentes en el proceso para facilitar la detección y la cuantificación del proceso de amplificación.

En la Fig. 1a se muestra un conjunto de curvas típicas de PCR a tiempo real, en las que los valores de intensidad de la fluorescencia se representan frente al número de ciclos de un proceso de PCR típico. En este caso, la formación de los productos de PCR se monitoriza en cada ciclo del proceso de PCR. La amplificación normalmente se mide en termocicladores que incluyen componentes y dispositivos para medir las señales de fluorescencia durante la
25 reacción de amplificación. Un ejemplo de tal termociclador es el LightCycler de Roche Diagnostics (Nº Cat. 20110468). Los productos de amplificación, por ejemplo, se detectan mediante sondas de hibridación con un marcaje fluorescente que emiten señales de fluorescencia cuando están unidas al ácido nucleico diana o en ciertos casos también mediante colorantes fluorescentes que se unen al DNA de doble cadena. Como puede observarse en la Fig. 1a, las curvas de PCR incluyen una región de línea basal 5 y una región meseta 6. La región entre la región de línea basal 5 y la región meseta 6 es normalmente denominada la región de crecimiento.

Los sistemas de detección de PCR típicos para analizar las emisiones de radiación a partir de los experimentos de PCR incluyen dos o más filtros que pueden utilizarse cada uno de ellos para aislar un rango de longitudes de onda para su posterior análisis. Por ejemplo, cada filtro óptico normalmente permite el paso de sustancialmente toda la radiación dentro de un rango definido de longitudes de onda. Sin embargo, las sondas o marcadores normalmente emiten con bandas de longitud de onda que se solapan parcialmente y la banda de paso del filtro normalmente incluye una región de este solapamiento, de forma que cada canal de detección normalmente recibirá señal emitida por otras sondas. Estas señales de interferencia tienden a afectar la señal real de interés. De acuerdo con esto, es deseable realizar una corrección de estas señales de interferencia en cada canal de detección. Un modo habitual de
40 realizar esto es determinar los coeficientes de interferencia cuantitativos que pueden utilizarse para corregir las señales de interferencia de cada canal de detección.

En las metodologías de interferencia actuales, como las que se ejemplifican en la patente US-A-2004 0259260, los coeficientes de interferencia normalmente se calculan utilizando la proporción entre los valores meseta promedios de una señal basal y una de interferencia; los métodos convencionales se basan exclusivamente en la región meseta, que contiene menos del 10% de los datos. Además, durante la PCR, la señal de región meseta se genera cuando reacción química está en un estado inestable. Por este motivo, normalmente se utiliza un umbral de la señal de línea basal para la identificación de la diana. Por lo tanto, los métodos convencionales utilizan una señal con ruido para determinar los coeficientes de interferencia con información limitada que no incluye datos de la señal real de la región de adquisición sobre la curva. Además, también se ha descubierto que las presunciones incorrectas utilizadas en los modelos convencionales de interferencia inducen errores en función de la curva de adquisición de datos. Así, los métodos convencionales de calcular coeficientes de interferencia pueden ser satisfactorios siempre que (1) exista una meseta, (2) esta meseta sea plana y (3) el ruido en la meseta sea mínimo. Sin embargo, existen muchos conjuntos de datos en los que no se dan estas condiciones.

Por lo tanto es deseable proporcionar sistemas y métodos para determinar los coeficientes de interferencia en curvas como las curvas de tipo sigmoide o de crecimiento, y las de curvas PCR en particular, que solucionen los problemas anteriores y otros.

60 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona sistemas y métodos para determinar los coeficientes de interferencia en curvas, como las curvas de tipo sigmoide o de crecimiento, y las curvas de PCR en particular. La presente invención también proporciona sistemas y métodos para aplicar los coeficientes de interferencia para obtener conjuntos de
65 datos corregidos para la interferencia utilizando un modelo de sustracción lineal.

De acuerdo con varias realizaciones, los coeficientes de la señal de interferencia se determinan minimizando la suma de los cuadrados de la diferencia entre una señal base (veces de ganancia más un término lineal opcional) y una señal de interferencia. Se ha demostrado que esta técnica es superior a las técnicas convencionales que utilizan una proporción de los valores promedio de meseta de una señal base y una señal de interferencia. Adicionalmente, esta técnica analiza los datos a lo largo del rango completo de adquisición de la señal para determinar los coeficientes de interferencia. Por ejemplo, pueden utilizarse todos los datos a lo largo del rango de adquisición o porciones de datos a lo largo del rango completo de adquisición. El análisis a lo largo de todos los datos de la curva señal proporciona una corrección de la interferencia más robusta a lo largo de todo el rango de adquisición de datos. Además, los métodos convencionales asumen que las señales medidas a partir de todas las fuentes siguen un modelo aditivo lineal y que todas las señales se analizan entre los detectores, y esto no es cierto, por lo que resulta tanto en sobrecorrecciones e infracorrecciones de la señal resultante. Por el contrario, las técnicas de la presente invención utilizan un modelo de sustracción lineal que supera este problema y que representa un modelo más ajustado a los sistemas de detección reales. Estas nuevas técnicas hallarán su mayor utilidad en los ejemplos en los que los coeficientes de interferencia están en el rango del 2% o superior.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar los coeficientes de interferencia para un sistema de detección óptica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con al menos dos elementos ópticos, en los que cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango específico de longitudes de ondas electromagnéticas diferente. El método incluye la adquisición, para cada elemento óptico, de un conjunto de datos de PCR a lo largo de un rango de adquisición de un proceso de crecimiento de PCR, y simultáneamente la adquisición, para cada uno de los demás elementos ópticos, de un conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición. El método también incluye la determinación de los coeficientes de interferencia utilizando los conjuntos de datos de PCR y de interferencia. En ciertos aspectos, el rango de adquisición incluye una región de línea basal, una región de crecimiento y una región meseta. La determinación de los coeficientes de interferencia incluye minimizar la suma de los cuadrados o los valores absolutos de las diferencias entre cada conjunto de datos de PCR y conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición. En ciertos aspectos, los coeficientes de interferencia se aplican a un conjunto de datos de PCR para obtener un conjunto de datos de PCR corregidos para la interferencia. En ciertos aspectos, se utiliza un modelo de sustracción lineal para aplicar los coeficientes de interferencia.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un medio legible mediante un computador que incluye o almacena código que controla un procesador para determinar los coeficientes de interferencia de un sistema de detección óptica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con al menos dos elementos ópticos, en los que cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango específico de longitudes de ondas electromagnéticas diferentes. El código incluye las instrucciones para recibir, de cada elemento óptico, un conjunto de datos de PCR adquiridos a lo largo de un rango de adquisición de un proceso de crecimiento de PCR, y simultáneamente recibir, para cada uno de los demás elementos ópticos, un conjunto de datos de interferencia para cada filtro adquirido a lo largo del rango de adquisición. El código también incluye instrucciones para determinar los coeficientes de interferencia utilizando los conjuntos de datos de PCR y de interferencia. En ciertos aspectos, el rango de adquisición incluye una región de línea basal, una región de crecimiento y una región meseta. El código para la determinación de los coeficientes de interferencia incluye código para la determinación de los coeficientes de interferencia minimizando la suma de los cuadrados o los valores absolutos de las diferencias entre cada conjunto de datos de PCR y cada conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cinética que normalmente incluye un módulo de detección óptica con al menos dos elementos ópticos, en los que cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango específico de longitudes de ondas electromagnéticas diferentes, en el que se adapta el módulo de detección óptica para adquirir, para cada elemento óptico, un conjunto de datos de PCR a lo largo de un rango de adquisición de un proceso de crecimiento de PCR, y simultáneamente adquirir, para cada uno de los demás elementos ópticos, un conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición. El sistema también incluye un módulo de inteligencia adaptado para procesar los conjuntos de datos de PCR y conjuntos de datos de interferencia adquiridos para determinar los coeficientes de interferencia. En ciertos aspectos, el rango de adquisición incluye una región de línea basal, una región de crecimiento y una región meseta. El módulo de inteligencia determina los coeficientes de interferencia minimizando la suma de los cuadrados o los valores absolutos de las diferencias entre cada conjunto de datos de PCR y cada conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de análisis de la fusión de un ácido nucleico que incluye un módulo de detección óptica con al menos dos elementos ópticos, en el que cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango específico de longitudes de ondas electromagnéticas diferentes. El módulo de detección óptica está adaptado para adquirir, para cada elemento óptico, un conjunto de datos de fusión a lo largo de un rango de adquisición de temperatura, y simultáneamente adquirir, para cada uno de los demás elementos ópticos, un conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición de temperatura. El módulo de detección óptica también está adaptado para determinar los coeficientes de interferencia minimizando la suma de los cuadrados entre cada conjunto de datos de fusión y conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición.

En referencia al resto de porciones de la especificación, incluyendo las figuras y reivindicaciones, se referirán a otras características y ventajas de la presente invención. A continuación se describen en detalle otras características y ventajas de la presente invención, así como la estructura y funcionamiento de varias realizaciones de la presente invención, con respecto a las figuras acompañantes. En las figuras, los mismos números de referencia indican
5 elementos idénticos o similares a nivel funcional.

Breve descripción de las figuras

10 La Fig. 1a ilustra un conjunto de curvas de PCR a tiempo real típicas, en las que los valores de intensidad de fluorescencia están representados frente al número de ciclos de un proceso de PCR típico.

La Fig. 1b ilustra un proceso para determinar los coeficientes de interferencia de un sistema de detección que analiza los procesos de amplificación de PCR utilizando dos o más canales de detección.

15 La Fig. 2 ilustra un caso específico de dos canales: la señal de FAM y su interferencia en el canal de HEX para un sistema de detección de dos canales.

La Fig. 3 ilustra el solapamiento de los espectros de dos colorantes en dos rangos de filtro.

20 La Fig. 4 muestra 24 representaciones de residuos individuales cuando se analizan los canales de FAM y HEX utilizando el método convencional con diana en el canal de FAM y no en el canal de HEX.

La Fig. 5 muestra las veinticuatro representaciones completas de la Fig. 4.

25 La Fig. 6 muestra una superposición de las veinticuatro representaciones de la Fig. 4.

Las Fig. 7-9 muestran las representaciones de residuos completos de un conjunto de datos procesados de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

30 Las Fig. 10-12 muestran las representaciones residuales superimpuestas correspondientes a las representaciones que se muestran en las Fig. 7-9, respectivamente.

35 La Fig. 13 muestra un conjunto de datos de un experimento de PCR de un ensayo del VIH con diana en el filtro de FAM y no en el filtro de HEX.

La Fig. 14 muestra un conjunto de datos de interferencia del canal de HEX que corresponden al ensayo del VIH de la Fig. 13.

40 Las Fig. 15, 16 y 17 muestran la señal corregida para la interferencia en el canal de HEX utilizando el método convencional y dos realizaciones de la presente invención, respectivamente.

La Fig. 18 muestra un diagrama de bloques general que ilustra la relación entre los recursos de software y hardware.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención proporciona sistemas y métodos para determinar coeficientes de interferencia y para obtener conjuntos de datos corregidos para la interferencia utilizando los coeficientes de interferencia, particularmente para los sistemas de detección de la PCR y los conjuntos de datos de PCR y de fusión de ácidos nucleicos. La presente invención también proporciona sistemas y métodos para aplicar los coeficientes de interferencia para obtener
50 conjuntos de datos corregidos para la interferencia utilizando a modelo lineal sustractivo.

Aunque el resto de este documento discutirá realizaciones y aspectos de la invención en términos de su aplicabilidad a los de conjuntos de datos PCR, debe hacerse notar que la presente invención puede aplicarse a los conjuntos de datos relacionados con otros procesos. Ejemplos de otros procesos que pueden proporcionar similar curvas de tipo sigmoide o de crecimiento, o que de otro modo pueden procesarse de acuerdo con las técnicas de la presente invención incluyen los procesos bacterianos, procesos de fusión, procesos de crecimiento microbianos, procesos enzimáticos (por ejemplo las reacciones cinéticas enzimáticas) y los procesos de unión. Por ejemplo, las técnicas de la presente invención también son aplicables al análisis de datos a partir de procesos de fusión de ácidos nucleicos y procesos similares.
60

Como se muestra en la Fig. 1a, los datos de una curva de crecimiento típica de PCR pueden representarse en un sistema coordinado de dos dimensiones, por ejemplo, con el número de ciclos de PCR definido en el eje x y un indicador del crecimiento acumulativo de polinucleótidos definido n el eje y. Normalmente, como se muestra en la Fig. 1a, el indicador del crecimiento acumulativo de polinucleótidos es un valor de intensidad de la fluorescencia ya que el uso de marcadores fluorescentes es quizás el esquema de marcaje más ampliamente utilizado. Sin embargo, debe entenderse que otros indicadores pueden utilizarse dependiendo del esquema de marcaje y/o detección
65

particular. Ejemplos de otros indicadores útiles de señal acumulada de crecimiento incluyen la intensidad de luminiscencia, intensidad de quimioluminiscencia, intensidad de bioluminiscencia, intensidad de fosforescencia, transferencia de carga, voltaje, corriente, potencia, energía, temperatura, viscosidad, dispersión de luz, intensidad de radioactividad, reflectividad, transmitancia y absorbancia. La definición de ciclo también puede incluir el tiempo, ciclos del proceso, ciclos de operación de la unidad y ciclos reproductivos.

Resumen general del proceso

De acuerdo con la presente invención, una realización de un proceso 100 para determinar los coeficientes de interferencia de un sistema de detección que analiza procesos de amplificación de PCR utilizando dos o más canales de detección puede describirse brevemente haciendo referencia a la Fig. 1b. En ciertos aspectos, un sistema de detección de PCR incluye detectores para analizar las emisiones de radiación de los experimentos de PCR. El sistema de detección incluye dos o más elementos ópticos que pueden utilizarse para aislar un rango de longitudes de onda para su posterior análisis. Estos elementos ópticos normalmente se seleccionan para que coincidan con las características de emisión de las sondas o marcadores fluorescentes utilizados en los procesos de amplificación de PCR, por ejemplo, aíslan radiación de la banda de emisión de un colorante en particular. Por ejemplo, en ciertos aspectos, los elementos ópticos incluyen uno o más filtros ópticos que permiten el paso de sustancialmente toda la radiación en un rango de longitud de onda definido. Otros elementos ópticos pueden incluir rejillas de difracción. Cada elemento óptico define un canal de detección, por ejemplo, un rango de longitudes de onda que recibe un elemento detector.

En una realización ejemplar de la presente invención, el método puede implementarse utilizando sistemas de computador personal convencional, lo que incluye pero no se limita a un dispositivo de entrada para introducir un conjunto de datos, como un teclado, ratón y similares; una dispositivo que muestra los datos para representar un punto específico de interés en una región de una curva, como un monitor; un dispositivo de procesamiento necesario para realizar cada uno de los pasos del método, como una CPU; una interfaz de red como un módem, un dispositivo de almacenamiento de datos para almacenar el conjunto de datos, un código informático ejecutándose en el procesador y similares. Además, el método también puede implementarse en un dispositivo de PCR.

En el paso 110, para cada canal de detección se recibe o se adquiere de otro modo un conjunto de datos experimental que representa una o más curvas de PCR. En ciertos aspectos, los datos son adquiridos a lo largo del rango completo de adquisición del sistema de detección, por ejemplo, a lo largo de la región de la línea basal, la región de transición y la región meseta. Un ejemplo de un conjunto de datos de PCR representados (conjunto de una o más curvas de datos de PCR) se muestra en la Fig. 2A, en la que los ejes y y x representan la intensidad de la fluorescencia y el número de ciclos, respectivamente, de una curva de PCR. En ciertos aspectos, el conjunto de datos debe incluir datos que estén espaciados de forma equitativa a lo largo de un eje. Sin embargo, pueden existir uno o más puntos de datos perdidos. En el paso 120, de forma simultánea con el paso 110, para cada uno de los demás canales, se adquiere un conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición. Un ejemplo de conjunto de datos de interferencia se muestra en la Fig. 2B. En el paso 130, los conjuntos de datos se procesan para determinar los coeficientes de interferencia como se describirán en más detalle a continuación. En ciertos aspectos, se minimiza la suma de los cuadrados entre cada conjunto de datos de PCR y conjunto de datos de interferencia como se describirá a continuación. En otros aspectos, se minimiza una suma de los valores absolutos de la diferencia entre el conjunto de datos de PCR y el conjunto de datos de interferencia.

En el caso de que el proceso 100 se implemente en un módulo de inteligencia (por ejemplo, instrucciones de ejecución del procesador) residente en un dispositivo de adquisición de datos de PCR como un termociclador, el conjunto de datos pueden proporcionarse al módulo de inteligencia a tiempo real a medida que los datos se van registrando, o pueden almacenarse en una unidad de memoria o tampón y proporcionarse al módulo de inteligencia después de que el experimento se haya completado. De forma similar, el conjunto de datos puede proporcionarse a un sistema separado como un sistema de computador de sobremesa u otro sistema de computador, a través de una conexión de red (por ejemplo, LAN, VPN, intranet, Internet, etc.) o una conexión directa (por ejemplo, un USB u otra conexión con o sin cable directa) al dispositivo de adquisición, o se proporciona en un medio portátil como un CD, DVD, disco flexible o similares.

La Fig. 18 muestra a diagrama de bloques general que explica la relación entre los recursos de software y hardware. El sistema comprende un módulo de análisis de PCR cinética que puede estar localizado en un dispositivo termociclador y un módulo de inteligencia que es parte del sistema de computador. Los conjuntos de datos (conjuntos de datos de PCR) se transfieren del módulo de análisis al módulo de inteligencia o viceversa a través de una conexión de red o de una conexión directa. Los conjuntos de datos se procesan de acuerdo con el método como se ilustra en la Fig. 1b mediante un código informático ejecutado en el procesador y que se almacena en el dispositivo de almacenaje del módulo de inteligencia y tras su procesamiento se transfiere de nuevo al dispositivo de almacenaje del módulo de análisis, en el que los datos modificados pueden mostrarse en un dispositivo de visualización.

En ciertos aspectos, el conjunto de datos incluye puntos de datos con un par de valores coordinados (o un vector bidimensional). Para los datos de PCR, el par de valores coordinados normalmente representa el número de ciclos y el valor de intensidad de la fluorescencia.

5 Tras haber determinado los coeficientes de interferencia en paso 130, los coeficientes de interferencia determinados pueden aplicarse al conjunto de datos de PCR original o a uno nuevo para obtener un conjunto de datos corregido para la interferencia en el paso 140. En el paso 150, los coeficientes de interferencia y/o conjunto de datos de PCR corregidos para la interferencia u otros datos pueden almacenarse en una unidad de memoria, proporcionarse a un sistema diferente, por ejemplo, a través de una conexión de red o a través de un medio de almacenamiento portátil, o mostrarse en un dispositivo de visualización como un monitor o impresora.

Determinación de los coeficientes de interferencia

15 En los modelos de interferencia convencionales, los coeficientes de interferencia normalmente se calculan como sigue:

Se asume que una muestra única contiene dos colorantes visibles con espectros únicos que se solapan. El sistema de detección consiste en dos filtros de los espectros de luz únicos, cada uno de los cuales deja pasar alrededor del 95% del espectro de uno de los colorantes y alrededor del 5% del espectro del otro colorante. Normalmente cada filtro está optimizado para que pase la luz de sólo uno de los colorantes. La luz que pasa por cada uno de los filtros se considera que es el canal uno y dos respectivamente.

(1) Se toma el promedio de cinco puntos de datos de la región meseta de la señal del canal 1 y 2:

25 PL_{Avg1} = promedio (cinco puntos de la meseta del canal 1)

PL_{Avg2} = promedio (cinco puntos de la meseta del canal 2)

(2) Se computa el coeficiente de interferencia para la muestra:

30 $XT_{\text{-colorante 2- canal 1}} = PL_{Avg2} / PL_{Avg1}$

(3) A continuación, se aumenta el tamaño de muestra a una microplaca de 96 pocillos y computar XT para el canal 1 -> canal 2:

35 $XT_{(1 \rightarrow 2)} = \text{promedio}(XT_1, XT_2, \dots, XT_{96})$

40 Este método convencional de calcular la interferencia es satisfactorio siempre que (1) exista una meseta, (2) la meseta sea plana, y (3) exista un ruido mínimo en la meseta. Sin embargo, existen muchos conjuntos de datos en los que este no es el caso.

De acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, se proporcionan métodos para aumentar la exactitud de cálculo de los coeficientes de interferencia. De acuerdo con ciertos aspectos, los coeficientes de interferencia se determinan utilizando técnicas de optimización similares a la regresión lineal. Si se define "Señal" como la señal base y "SeñalXT" como la señal de interferencia, el subíndice i como el número de ciclos, q como la ganancia multiplicativa, r y s como la intersección y la pendiente, pueden describirse tres realizaciones de ejemplo mediante las siguientes ecuaciones:

50 (1) Se minimiza la suma de los cuadrados entre cada señal fluorescente y la señal de interferencia utilizando una ganancia simple "q" como se muestra en la Ecuación (1) a continuación.

$$\min [\sum_i (\text{Señal}XT_i - q * \text{Señal}_i)^2] \quad (1)$$

55 (2) Se minimiza la suma de los cuadrados entre cada señal fluorescente y señal de interferencia utilizando una intersección "r" y una pendiente "s" común, pero una ganancia simple individual "q" como se muestra en la ecuación (2) a continuación. Esto resulta en un coeficiente de interferencia para cada canal y un término lineal común para todos los canales.

$$\min [\sum_i (\text{Señal}XT_{1i} - (r+s*i+q_1*\text{Señal}_i))^2 + (\text{Señal}XT_{2i} - (r+s*i+q_2*\text{Señal}_i))^2 + (\text{Señal}XT_{3i} - (r+s*i+q_3*\text{Señal}_i))^2] \quad (2)$$

60 (3) Se minimiza la suma de los cuadrados entre cada señal fluorescente y señal de interferencia utilizando una intersección "r", pendiente "s" y ganancia simple "q" como se muestra en la ecuación (3) a continuación. Esto resulta en un coeficiente de interferencia y un término lineal para cada canal.

$$65 \min [\sum_i (\text{Señal}XT_i - (r + s*i + q*\text{Señal}_i))^2] \quad (3)$$

En otros aspectos, se minimiza una suma de los valores absolutos de la diferencia entre el conjunto de datos de PCR y el conjunto de datos de interferencia. Pueden utilizarse otros métodos de minimización, como por ejemplo, los métodos de Levenberg-Marquardt, métodos de programación lineal, métodos de Nelder-Mead, métodos de bajada del gradiente, métodos de subgradiente, métodos simplex, métodos de los elipsoides, métodos del haz, método de Newton, métodos cuasi-Newton, métodos de punto interior y otros métodos que serán evidentes para el experto en la materia.

Una ventaja de estas diferentes realizaciones es que los datos a lo largo del rango completo de adquisición de señal se utilizan para determinar los coeficientes de interferencia. Por ejemplo, pueden utilizarse todos los datos a lo largo del rango de adquisición, o pueden utilizarse porciones de datos a lo largo del rango completo de adquisición. Esto proporciona unos coeficientes de interferencia que compensa los errores sistemáticos de adquisición de datos. Por el contrario, los métodos convencionales se basan exclusivamente en la región meseta que contiene menos del 10% de los datos. Las realizaciones de la presente invención también proporcionan ventajas adicionales a ensayos como la PCR. Durante la PCR, la señal de la región meseta se genera cuando la mayoría de las sondas se han consumido. Por esta razón, normalmente se utiliza la señal de la línea basal para la identificación de la diana. Por lo tanto, los métodos convencionales utilizan una señal con ruido para determinar los coeficientes de interferencia con información limitada que no incluye datos del verdadero punto de adquisición de señal de la curva. Además, las presunciones incorrectas que se utilizan en los modelos de interferencia convencionales también se ha detectado que inducen a errores en función de la curva de adquisición de datos. Utilizando la curva completa para el cálculo de interferencia se eliminan algunas de estas presunciones erróneas. El uso posterior de los modelos correctos también elimina virtualmente los errores de corrección de la interferencia.

De acuerdo con ciertos aspectos, se realiza una sustracción del ruido de fondo y/o de la línea basal sobre el conjuntos de datos que representan todas las señales (señal basal y señales de interferencia) previamente a la determinación de los coeficientes de interferencia. Una sustracción del ruido de fondo normalmente se realiza sustrayendo una señal tampón única para cada canal. Una sustracción de la línea basal normalmente se realiza definiendo una línea basal (por ejemplo, pendiente e intersección) y sustrayendo esta línea basal de todos los valores de la señal (señal basal y señal de interferencia). La línea basal puede definirse especificando un valor de inicio y de final de la línea basal y realizando una regresión lineal entre estos puntos, o mediante ajuste de la curva a una función (como una función de doble sigmoide) y utilizando los parámetros de pendiente e intersección de esta función como línea basal.

En ciertos aspectos, determinar una línea basal incluye realizar una regresión lineal sobre un conjunto de datos entre posiciones definidas del inicio de la línea basal y del final de la línea basal. En otros aspectos determinar una línea basal incluye un ajuste de la curva a una función de doble sigmoide para identificar los valores de la pendiente y la intersección.

En aspectos particulares, el método puede incluir la eliminación de puntos atípicos o "aberrantes" a partir de uno o más de los conjuntos de datos (señales) de PCR y de los conjuntos de datos de interferencia previamente a la determinación de los coeficientes de interferencia. Las solicitudes de patente estadounidenses con N° de serie 11/316.315, titulada "Método de eliminación de puntos atípicos aberrantes de Levenberg Marquardt", y 11/349.550, titulada "Determinación del codo de la PCR mediante el uso de un ajuste de la curva a una función de doble sigmoide con el algoritmo y la normalización de Levenberg-Marquardt," describen tales técnicas de ajuste a una función de doble sigmoide para determinar, entre otros, los parámetros de pendiente y intersección de la curva de PCR, y también para la identificación y la eliminación de puntos atípicos o "aberrantes" en un conjunto de datos de PCR.

En ciertos aspectos del método, los elementos ópticos incluyen uno o más filtros, y cada filtro permite el paso de un rango específico de longitudes de onda diferentes. En realizaciones particulares, el sistema incluye al menos cuatro filtros.

En otros aspectos, el método incluye mostrar o generar los coeficientes de interferencia determinados y/o almacenar los coeficientes de interferencia determinados en un módulo de memoria para su posterior uso en la obtención de conjuntos de datos corregidos para la interferencia.

La invención también está relacionada con un medio legible por computador que incluye el código para controlar un procesador para determinar los coeficientes de interferencia para un sistema de detección óptica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con al menos dos elementos ópticos, en los que cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango específico de longitudes de ondas electromagnéticas diferentes, y el código incluye instrucciones para recibir, de cada elemento óptico, un conjunto de datos de PCR adquirido a lo largo de un rango de adquisición de un proceso de crecimiento de PCR, cuyo rango de adquisición incluye una región de línea basal, una región de crecimiento y una región meseta; para recibir simultáneamente, para cada uno de los demás elementos ópticos, un conjunto de datos de interferencia para cada filtro adquirido a lo largo del rango de adquisición; y para determinar los coeficientes de interferencia utilizando los conjuntos de datos de PCR y de

interferencia a lo largo del rango de adquisición. En ciertos aspectos, los elementos ópticos incluyen uno o más filtros ópticos, y cada filtro permite el paso de la luz a un rango diferente de longitudes de onda específicas.

5 En otro aspecto del medio legible por computador, el rango de adquisición de datos representa una pluralidad de ciclos de PCR, en el que la determinación de coeficientes de interferencia incluye minimizar la suma de los cuadrados entre cada conjunto de datos de PCR y conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición.

En realizaciones particulares minimizar la suma de los cuadrados incluye utilizar una ecuación con la forma:

10
$$\min [\sum_i (\text{SeñalXT}_i - q * \text{Señal}_i)^2]$$

en la que i es el número de ciclos de PCR, Señal_i es el conjunto de datos de PCR de un elemento óptico, SeñalXT_i es el conjunto de datos de interferencia de un elemento óptico, y en el que q es un factor multiplicador de ganancia.

15 En otras realizaciones, minimizar la suma de los cuadrados incluye utilizar una ecuación de forma:

$$\min [\sum_i ((\text{SeñalXT}_{1i} - (r+s*i+q1*\text{Señal}_i))^2 + (\text{SeñalXT}_{2i} - (r+s*i+q2*\text{Señal}_i))^2 + (\text{SeñalXT}_{3i} - (r+s*i+q3*\text{Señal}_i))^2]$$

20 en la que i es el número de ciclos de PCR, Señal_i es el conjunto de datos de PCR de un elemento óptico, XTSeñal_i es el conjunto de datos de interferencia de un elemento óptico, r es una distancia (del inglés *offset*) común, s es una pendiente común y en el que $q1$, $q2$ y $q3$ son factores multiplicadores de ganancia.

En otra realización, minimizar la suma de los de los cuadrados incluye utilizar una ecuación de forma:

25
$$\min [\sum_i (\text{SeñalXT}_i - (r+s*i + q*\text{Señal}_i))^2]$$

en la que i es el número de ciclos de PCR, Señal_i es el conjunto de datos de PCR de un elemento óptico, XTSeñal_i es el conjunto de datos de interferencia de un elemento óptico, r es una distancia (del inglés *offset*), s es una pendiente y en el que q es un factor multiplicador de ganancia.

30 En ciertos aspectos, el código también incluye instrucciones para determinar una línea basal de cada conjunto de datos de PCR y cada conjunto de datos de interferencia; y previamente a la determinación de los coeficientes de interferencia, para sustraer la respectiva línea basal de cada conjunto de datos. Aquí, las instrucciones para determinar una línea basal pueden incluir instrucciones para realizar una regresión lineal sobre un conjunto de datos entre posiciones definidas del inicio de la línea basal y del final de la línea basal. En otro aspecto, las instrucciones para determinar la línea basal pueden incluir instrucciones para el ajuste de la curva a una función de doble sigmoide para identificar los valores de la pendiente y la intersección.

40 En otros aspectos, el código también incluye instrucciones para eliminar los puntos atípicos de uno o más de los conjuntos de datos de PCR y los conjuntos de datos de interferencia previamente a la determinación de los coeficientes de interferencia. El código también puede incluir instrucciones para mostrar o generar los coeficientes de interferencia determinados. En otras realizaciones, el código también puede incluir instrucciones para almacenar los coeficientes de interferencia determinados en un módulo de memoria para su posterior utilización en la obtención de conjuntos de datos corregidos para la interferencia.

El código también puede incluir instrucciones para aplicar los coeficientes de interferencia determinados a un conjunto de datos de PCR utilizando un modelo de sustracción lineal para obtener un conjunto de datos corregido para la interferencia. Aquí, el modelo de sustracción lineal puede incluir una ecuación de forma:

50
$$f_{iC} = f_i - \left(\sum_{j \neq i} a_{ij} f_j \right)$$

en la que f_i es la señal medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia del canal (i), y en la que los coeficientes a_{ij} indican los coeficientes de interferencia del canal (j) en el canal (i).

En otro aspecto, el modelo de sustracción lineal puede incluir una ecuación de forma:

55
$$f_{iC} = f_i - \left(\sum_{j \neq i} a_{ij} f_j \right) - (r + s * i)$$

en la que f_i es la señal medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia del canal (i), y en la que los coeficientes a_{ij} indican los coeficientes de interferencia del canal (j) en el canal (i), y r y s son una ganancia y un término lineal, respectivamente, que son comunes para todos los canales (i).

En otro aspecto, el modelo de sustracción lineal puede incluir una ecuación de forma:

$$f_{ic} = f_i - \left(\sum_{j \neq i} a_{ij} f_j \right) - (r_i + s_i * i)$$

en la que f_i es la señal medida en el canal (i) y f_{ic} es la señal corregida para la interferencia del canal (i), y en la que los coeficientes a_{ij} indican los coeficientes de interferencia del canal (j) en el canal (i), y r_i y s_i son una ganancia y un término lineal, respectivamente, que son diferentes para cada canal (i)..

La invención también está relacionada con un sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cinética, que comprende un módulo de detección óptico con al menos dos elementos ópticos, y cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango diferente de longitudes de onda electromagnéticas específicas, en el que dicho módulo de detección óptica está adaptado para adquirir, para cada elemento óptico, un conjunto de datos de PCR a lo largo de un rango de adquisición de un proceso de crecimiento de PCR, cuyo rango de adquisición incluye una región de línea basal, una región de crecimiento y una región meseta; y para adquirir simultáneamente, para cada uno de los demás elementos ópticos, un conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición; y un módulo de inteligencia adaptado para procesar los conjuntos de datos de PCR y los conjuntos de datos de interferencia adquiridos para determinar los coeficientes de interferencia utilizando los conjuntos de datos de PCR y de interferencia a lo largo del rango de adquisición. En ciertos aspectos del sistema, el rango de adquisición de datos representa una pluralidad de ciclos de PCR y el módulo de inteligencia determina los coeficientes de interferencia minimizando la suma de los cuadrados entre cada conjunto de datos de PCR y cada conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición. Minimizar la suma de los cuadrados puede incluir la utilización de una ecuación de forma:

$$\min [\sum_i (\text{SeñalXT}_i - q * \text{Señal}_i)^2]$$

en la que i es el número de ciclos de PCR, Señal_i es el conjunto de datos de PCR de un elemento óptico, SeñalXT_i es el conjunto de datos de interferencia de un elemento óptico, y en el que q es un factor multiplicador de ganancia.

En otras realizaciones, minimizar la suma de los cuadrados incluye utilizar una ecuación de forma:

$$\min [\sum_i [(\text{SeñalXT}_{1i} - (r+s*i+q1*\text{Señal}_i))^2 + (\text{SeñalXT}_{2i} - (r+s*i+q2*\text{Señal}_i))^2 + (\text{SeñalXT}_{3i} - (r+s*i+q3*\text{Señal}_i))^2]$$

en la que i es el número de ciclos de PCR, Señal_i es el conjunto de datos de PCR de un elemento óptico, XTSeñal_i es el conjunto de datos de interferencia de un elemento óptico, r es una distancia (del inglés *offset*) común, s es una pendiente común y en el que $q1$, $q2$ y $q3$ son factores multiplicadores de ganancia.

En otras realizaciones, minimizar la suma de los de los cuadrados incluye utilizar una ecuación de forma:

$$\min [\sum_i (\text{SeñalXT}_i - (r+s*i + q*\text{Señal}_i))^2]$$

en la que i es el número de ciclos de PCR, Señal_i es el conjunto de datos de PCR de un elemento óptico, XTSeñal_i es el conjunto de datos de interferencia de un elemento óptico, r es una distancia (del inglés *offset*), s es una pendiente y en el que q es un factor multiplicador de ganancia.

En el sistema, el módulo de inteligencia también puede adaptarse para determinar una línea basal de cada conjunto de datos de PCR y cada conjunto de datos de interferencia y para sustraer la respectiva línea basal de cada conjunto de datos previamente a la determinación de los coeficientes de interferencia. En realizaciones particulares, el módulo de inteligencia determina una línea basal realizando una regresión lineal sobre un conjunto de datos entre posiciones definidas del inicio de la línea basal y del final de la línea basal. En otra realización particular, el módulo de inteligencia determina una línea basal mediante el ajuste de la curva a una función de doble sigmoide para identificar los valores de la pendiente y la intersección.

En ciertas realizaciones del sistema, el módulo de inteligencia también está adaptado para eliminar los puntos atípicos de uno o más de los conjuntos de datos de PCR y los conjuntos de datos de interferencia previamente a la determinación de los coeficientes de interferencia. En otras realizaciones del sistema, los elementos ópticos incluyen uno o más filtros, y cada filtro permite el paso de la luz en un rango diferente de longitudes de onda específicas.

En el sistema, el módulo de inteligencia también puede adaptarse para aplicar los coeficientes de interferencia determinados al conjunto de datos de PCR utilizando un modelo de sustracción lineal para obtener un conjunto de datos corregidos para la interferencia. En ciertas realizaciones, el modelo de sustracción lineal incluye una ecuación de forma:

$$f_{iC} = f_i - \left(\sum_{j \neq i} a_{ij} f_j \right)$$

en la que f_i es la señal medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia del canal (i), y en la que los coeficientes a_{ij} indican los coeficientes de interferencia del canal (j) en el canal (i). En otra realización, el modelo de sustracción lineal puede incluir una ecuación de forma:

$$f_{iC} = f_i - \left(\sum_{j \neq i} a_{ij} f_j \right) - (r + s * i)$$

5 en la que f_i es la señal medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia del canal (i), y en la que los coeficientes a_{ij} indican los coeficientes de interferencia del canal (j) en el canal (i), y r y s son una ganancia y un término lineal, respectivamente, que son comunes para todos los canales (i). En otra realización, el modelo de sustracción lineal puede incluir una ecuación de forma:

$$f_{iC} = f_i - \left(\sum_{j \neq i} a_{ij} f_j \right) - (r_i + s_i * i)$$

10 en la que f_i es la señal medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia del canal (i), y los coeficientes a_{ij} indican los coeficientes de interferencia del canal (j) en el canal (i), y en la que r_i y s_i son una ganancia y un término lineal, respectivamente, que son diferentes para cada canal (i)..

15 El sistema en ciertos aspectos también puede incluir un módulo de visualización, en el que el módulo de inteligencia también está adaptado para proporcionar datos al modulo de visualización para mostrar uno de los coeficientes de interferencia determinados o un conjunto de datos de PCR corregidos para la interferencia. En realizaciones particulares el sistema también puede incluir un módulo de memoria, en el que el módulo de inteligencia también está adaptado para almacenar los coeficientes de interferencia determinados en el módulo de memoria para su posterior uso en la obtención de conjuntos de datos corregidos para la interferencia.

20

Ejemplo utilizando el ensayo de calibración del HPV

25 Considérese un caso de dos canales específicos: la señal de FAM y su interferencia en el canal de HEX en un ensayo de calibración del HPV como se muestra en las Fig. 2A y 2B. FAM y HEX son dos colorantes fluorescentes bien conocidos con diferentes características de excitación y emisión. Las señales en las Fig. 2A y 2B son casi ideales, en tanto que existe una meseta plana bien definida con poco ruido. Por lo tanto, sería esperable que los coeficientes de interferencia fueran casi iguales calculados con el método convencional y con los métodos de las ecuaciones (1) a (3).

30 Análisis utilizando la metodología convencional para determinar los coeficientes de interferencia:

Tomar el promedio de cinco puntos en la región meseta de los datos de interferencia y dividirlos por el promedio de cinco puntos de la región meseta de la señal pura. El coeficiente de interferencia se define así como la media del coeficiente de interferencia de todos los pocillos del termociclador. Los resultados son (se muestran median te código de Mathematica®):

35

```

TableMean = 0 * Range[24];

For[j = 1, j ≤ 24, j ++,
  TableMean[[j]] = Mean[Table[FC1[[60 + i, j]], {i, 50, 55}]] /
    Mean[Table[FC1[[i, j]], {i, 50, 55}]];
]

TableMean

{0.0173338, 0.0171016, 0.016073, 0.015443, 0.0165934, 0.0181777,
 0.0170146, 0.0155421, 0.0166653, 0.0145379, 0.0150514, 0.014366,
 0.0160809, 0.0152727, 0.0147269, 0.0134197, 0.0135746, 0.0133044,
 0.0158858, 0.0163226, 0.0159318, 0.0148446, 0.0139202, 0.0146015}

MTM = Mean[TableMean]

0.0154911
    
```

Por lo tanto, en este ejemplo, el coeficiente de interferencia de FAM en HEX se determina que es de 0,01549. En la Tabla 1 a continuación se muestra un resumen del coeficiente de interferencia de FAM en HEX con los métodos de las ecuaciones (1) a (3):

5

Tabla 1

Método de cálculo	Coeficiente de interferencia	Distancia (del inglés Offset)	Término lineal
Existente	0,01549	--	--
Ecuación 1	0,01572	--	--
Ecuación 2	0,01470	0,03947	-0,00011043
Ecuación 3	0,01433	0,03132	0,00040327

La ecuación 1, que quizás es la más similar al método convencional, produce un coeficiente de interferencia casi idéntico, mientras las ecuaciones 2 y 3 difieren, ya que incluyen un término lineal.

10 Comparación de las matrices de interferencia: método convencional y ecuación (1)

Considérese un caso de cuatro canales específicos: es instructivo comparar todos los coeficientes de interferencia de FAM, HEX, JA270 y CY5.5 en un ensayo de calibración del HPV. En la Tabla 2 a continuación se muestran los coeficientes de interferencia calculados utilizando el método convencional, mientras en la Tabla 3 se muestran los coeficientes calculados utilizando las ecuaciones (1) a (3). La ecuación (1) no utiliza los elementos diagonales (a_{11} , a_{22} , a_{33} , a_{44}), así que estas casillas están marcadas con "-". Como se ha discutido anteriormente para este conjunto de calibración del HPV, que contiene una meseta plana bien definida con un ruido mínimo, es esperable que los dos conjuntos de coeficientes de interferencia sean prácticamente idénticos.

15

20

Tabla 2: Matriz de interferencia existente:

	FAM	HEX	JA270	CY5.5
Filtro FAM	0,9828	0,0023	0,0016	0,0014
Filtro HEX	0,0153	0,9970	0,0055	0,0019
Filtro JA270	0,0008	0,0005	0,9876	0,0027
Filtro CY5.5	0,0012	0,0002	0,0053	0,9940

Tabla 3: Matriz de interferencia calculada utilizando la ecuación 1:

	FAM	HEX	JA270	CY5.5
Filtro FAM	-	0,0024	0,0020	0,0021
Filtro HEX	0,0157	-	0,0063	0,0027
Filtro JA270	0,0013	0,0005	-	0,0032
Filtro CY5.5	0,0016	0,0003	0,0056	-

25

Por lo tanto, cualquier diferencia entre aplicar el método convencional frente a los métodos de las ecuaciones (1) a (3), en este ejemplo particular, sería debido a la aplicación matemática de los coeficientes de interferencia, no a los coeficientes en sí mismos. Debe notarse, sin embargo, que existen muchos ejemplos en los que los coeficientes de interferencia son muy diferentes cuando se compara el método actual con las ecuaciones (1) a (3).

30

Aplicación de los coeficientes de interferencia para obtener datos corregidos para la interferencia

El método convencional para aplicar los coeficientes de interferencia asume un modelo lineal aditivo que se muestra en las ecuaciones (4) a continuación:

35

$$\begin{aligned}
 f_1 &= a_{11}c_1 + a_{12}c_2 + a_{13}c_3 + a_{14}c_4 \\
 f_2 &= a_{21}c_1 + a_{22}c_2 + a_{23}c_3 + a_{24}c_4 \\
 f_3 &= a_{31}c_1 + a_{32}c_2 + a_{33}c_3 + a_{34}c_4 \\
 f_4 &= a_{41}c_1 + a_{42}c_2 + a_{43}c_3 + a_{44}c_4
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

en las que f_i es la señal medida, c_i es la señal del colorante fluorescente, y a_{ij} es la interferencia del canal J en el canal I.

40

Estos coeficientes de interferencia también tiene la propiedad de que

$$\sum_i a_{i,j} = 1 \quad (5)$$

El conjunto de ecuaciones (4) puede resolverse mediante la inversión de la matriz para dar lugar a la señal del colorante c_i , que se define como la señal corregida para la interferencia. Un problema con esta aproximación es que asume que toda la señal del canal J se separa entre los canales (1,2,3,4). Esto, en general, no es cierto.

De acuerdo con una realización, los coeficientes de interferencia se aplican utilizando un modelo lineal sustractivo para obtener conjuntos de datos corregidos para la interferencia. Un modelo de sustracción lineal para la ecuación (1) se muestra en las ecuaciones (6) a continuación:

$$\begin{aligned} f_{1C} &= f_1 - (a_{12}f_2 + a_{13}f_3 + a_{14}f_4) \\ f_{2C} &= f_2 - (a_{21}f_1 + a_{23}f_3 + a_{24}f_4) \\ f_{3C} &= f_3 - (a_{31}f_1 + a_{32}f_2 + a_{34}f_4) \\ f_{4C} &= f_4 - (a_{41}f_1 + a_{42}f_2 + a_{43}f_3) \end{aligned}$$

10 (6)

en la que f_i es la fluorescencia medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia en el canal (i). Los coeficientes $a_{i,j}$ indican los coeficientes de interferencia del canal (J) en el canal (I). Este modelo no hace presunciones acerca de la separación de la señal de base entre los diferentes canales.

15

Un modelo de sustracción lineal para la ecuación (2) se muestra en las ecuaciones (7) a continuación:

$$\begin{aligned} f_{1C} &= f_1 - (a_{12}f_2 + a_{13}f_3 + a_{14}f_4) - (r + s * i) \\ f_{2C} &= f_2 - (a_{21}f_1 + a_{23}f_3 + a_{24}f_4) - (r + s * i) \\ f_{3C} &= f_3 - (a_{31}f_1 + a_{32}f_2 + a_{34}f_4) - (r + s * i) \\ f_{4C} &= f_4 - (a_{41}f_1 + a_{42}f_2 + a_{43}f_3) - (r + s * i) \end{aligned}$$

(7)

20 en la que f_i es la fluorescencia medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia en el canal (i). Los coeficientes $a_{i,j}$ indican los coeficientes de interferencia del canal (J) en el canal (I). La ecuación (7) utiliza una ganancia y un término lineal, r y s, que son comunes para todos los canales.

25

Un modelo de sustracción lineal para la ecuación (3) se muestra en las ecuaciones (8) a continuación:

$$\begin{aligned} f_{1C} &= f_1 - (a_{12}f_2 + a_{13}f_3 + a_{14}f_4) - (r_1 + s_1 * i) \\ f_{2C} &= f_2 - (a_{21}f_1 + a_{23}f_3 + a_{24}f_4) - (r_2 + s_2 * i) \\ f_{3C} &= f_3 - (a_{31}f_1 + a_{32}f_2 + a_{34}f_4) - (r_3 + s_3 * i) \\ f_{4C} &= f_4 - (a_{41}f_1 + a_{42}f_2 + a_{43}f_3) - (r_4 + s_4 * i) \end{aligned}$$

(8)

30 en la que f_i es la fluorescencia medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia en el canal (i). Los coeficientes $a_{i,j}$ indican los coeficientes de interferencia del canal (J) en el canal (I). La ecuación (8) utiliza una ganancia y un término lineal, r y s, que son diferentes en cada canal.

También debe notarse, que de forma ventajosa, el cálculo de estas señales corregidas para la interferencia no requiere de inversión de la matriz. Además, en ciertos aspectos, las ecuaciones de (6) a (8) pueden modificarse en primer lugar mediante la sustracción de un ruido de fondo o línea basal tanto de la señal de base como de la señal de interferencia.

35

Comparación de la aplicación de Interferencia en una situación de dos colorantes

40 Considérense los espectros de colorantes que se muestran en la Fig. 3, en la que los espectros 10 representan el colorante 1 (FAM) y los espectros 20 representan el colorante 2 (HEX). Se desea eliminar la interferencia, representada por la región de solapamiento entre los colorantes FAM y HEX.

En el método convencional, la resolución de las ecuaciones (4) y (5) anteriores da lugar a los resultados que se muestran en las ecuaciones (9) y (10), a continuación, para la señal corregida para la interferencia de FAM como se observa con el filtro 1 y de HEX como se observa con el filtro 2 respectivamente.

5

$$c_1 = \frac{f_1(1 - a_{12}) - a_{12}f_2}{1 - a_{12} - a_{21}} \quad (9)$$

$$c_2 = \frac{f_2(1 - a_{21}) - a_{21}f_1}{1 - a_{12} - a_{21}} \quad (10)$$

10 La señal corregida para la interferencia utilizando la ecuación (1) para este sistema se proporciona como las ecuaciones (11) y (12) a continuación:

$$f_{1c} = f_1 - a_{12}f_2 \quad (11)$$

$$f_{2c} = f_2 - a_{21}f_1 \quad (12)$$

15

La ecuación (11) supera dos problemas asociados con la ecuación (9), es decir el multiplicador $(1 - a_{12})$ de f_1 , que causa una sobrecompensación de la interferencia, ya no está presente, y el denominador incorrecto tampoco está presente.

20

Comparación del método convencional y el nuevo método en un conjunto de datos de HPV

Se analizó un conjunto de datos de HPV, sólo con los canales FAM y HEX utilizando el método existente y las ecuaciones de (1) a (3). Estos datos contenían la diana en el canal de FAM y no había diana en el canal de HEX. Estos métodos se aplicaron a la señal de interferencia en el canal de HEX y se examinaron los gráficos residuales resultantes. Idealmente, los residuales deberían estar centrados alrededor de una intersección cero con una pendiente de cero.

25

a) Gráficos residuales utilizando el método convencional

30

La Fig. 4 muestra los 24 gráficos residuales individuales, mientras la Fig. 5 muestra los veinticuatro gráficos completos. La Fig. 6 muestra una superposición de los veinticuatro gráficos. En una corrección óptima, se esperaría que los residuales se situaran centrados alrededor del eje x con una pendiente y una intersección de cero. En la Fig. 4, sin embargo, la mayoría de gráficos muestran que los residuales decrecen sustancialmente desde el ciclo 1 hasta el ciclo 60, lo que indica una implementación de la interferencia no óptima.

35

Al observar la Fig. 6 (la superposición de los veinticuatro gráficos de la Fig. 4), queda claro que existe una tendencia a una reducción significativa desde el ciclo 1 al ciclo 60, cuando se utiliza el método convencional para la interferencia.

40

b) Gráficos residuales utilizando las ecuaciones de (1) a (3).

Las Fig. 7-9 muestran los gráficos residuales completos para las ecuaciones de (1) a (3), respectivamente. Asimismo, las Fig. 10-12 muestran los gráficos residuales superimpuestos de las ecuaciones de (1) a (3). Comparando las Fig. 6 con las Fig. 10-12, es aparente que, de forma ventajosa, el rango de los residuales utilizando las técnicas de la presente invención son menores que en el método convencional. Además, utilizando las técnicas de la presente invención, las líneas de tendencia de los gráficos superimpuestos poseen pendientes e intersecciones mucho más cercanas a la meta de cero. En este ejemplo, la interferencia de FAM y HEX fue de alrededor del 2%. Por lo tanto, estos gráficos muestran una corrección más óptima, lo que indica la robustez de las técnicas de la presente invención. La superioridad de las técnicas de la presente invención se harán incluso más aparentes en los ejemplos en los que hay más colorantes presentes y la interferencia está en el rango de entre 2 y 20%.

45

50

Comparación del método convencional y el nuevo método en un conjunto de datos del HIV

Un experimento de PCR de un ensayo del HIV con la diana en el filtro de FAM y sin diana en el de filtro HEX se muestra en las Fig. 13 y 14 para los filtros de FAM y HEX, respectivamente. Utilizando los datos en las Fig. 13 y 14,

55

el coeficiente de interferencia de la interferencia FAM->HEX (a_{21}) se calcula que es $a_{21} = 0,051$ tanto con el método convencional como con la ecuación (1).

5 Las Fig. 15, 16, y 17 muestran la señal corregida para la interferencia en el canal de HEX utilizando el método convencional, la ecuación (1) y la ecuación (3), respectivamente. Puede verse que la sobrecorrección de las señales se reduce en gran medida utilizando cualquiera de los dos últimos métodos.

10 Debe apreciarse que los procesos de determinación del coeficiente de interferencia, lo que incluye los procesos de corrección de la interferencia, descritos aquí pueden implementarse en un código informático que se ejecuta en un procesador de un sistema informático. El código incluye instrucciones para controlar un procesador para implementar varios aspectos y pasos de los procesos. El código normalmente está almacenado en un disco duro, RAM o medio portátil como un CD, DVD, etc. De forma similar, los procesos pueden implementarse en un dispositivo de PCR como un termociclador que incluye un procesador que ejecuta las instrucciones almacenadas en una unidad de memoria acoplada al procesador. El código que incluye tales instrucciones puede descargarse a la unidad de memoria del dispositivo de PCR a través de una conexión de red o una conexión directa a una fuente de código o
15 utilizando un medio portátil como es bien conocido.

20 Un experto en la materia apreciará que la determinación del coeficiente de interferencia y los procesos de corrección de la interferencia de la presente invención pueden codificarse utilizando una variedad de lenguajes de programación, como C, C++, C#, Fortran, VisualBasic, etc., así como aplicaciones como Mathematica®, que proporcionan rutinas pre-empaquetadas, funciones y procedimientos útiles para la visualización y análisis de datos. Otro ejemplo de esto último es MATLAB .

25 Mientras la invención se ha descrito mediante ejemplos y en términos de realizaciones específicas, debe entenderse que la invención no se limita a las realizaciones descritas. Al contrario, se pretende incluir varias modificaciones y ajustes similares que serán aparentes para el experto en la materia. Por lo tanto, el alcance de las reivindicaciones anexas se debe conferir a la interpretación más amplia de forma que se engloben todas estas modificaciones y ajustes similares.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar los coeficientes de interferencia de un sistema de detección óptica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con al menos dos elementos ópticos, en el que cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango diferente de longitud de onda electromagnética específico, y este método comprende:

-la adquisición, para cada elemento óptico, de un conjunto de datos de PCR a lo largo de un rango de adquisición de un proceso de crecimiento de PCR;
 -simultáneamente la adquisición, para cada uno de los demás elementos ópticos, de un conjunto de datos de interferencia producido por un solapamiento de al menos los espectros de dos colorantes en al menos dos rangos de filtro, cuyo conjunto de datos de interferencia se ha adquirido a lo largo del rango de adquisición; y
 -la determinación de los coeficientes de interferencia utilizando los conjuntos de datos de PCR y de interferencia a lo largo del rango de adquisición, en la que la determinación de los coeficientes de interferencia incluye minimizar la suma de los cuadrados o los valores absolutos de las diferencias entre el conjunto de datos de PCR y el conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el rango de adquisición de datos representa una pluralidad de ciclos de PCR, y en el que la determinación de coeficientes de interferencia incluye minimizar la suma de los cuadrados entre cada conjunto de datos de PCR y cada conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que minimizar la suma de los cuadrados incluye utilizar una ecuación de forma:

$$\min [\sum_i (\text{SeñalXT}_i - q * \text{Señal}_i)^2]$$

en la que i es el número de ciclos de PCR, en el que Señal_i es el conjunto de datos de PCR para un elemento óptico, en el que SeñalXT_i es el conjunto de datos de interferencia para un elemento óptico, y en el que q es un factor multiplicador de ganancia.

4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que minimizar la suma de los cuadrados incluye utilizar una ecuación de forma:

$$\min [\sum_i [(\text{SeñalXT}_{1i} - (r+s*i+q1*\text{Señal}_i))^2 + (\text{SeñalXT}_{2i} - (r+s*i+q2*\text{Señal}_i))^2 + (\text{SeñalXT}_{3i} - (r+s*i+q3*\text{Señal}_i))^2]]$$

en la que i es el número de ciclos de PCR, Señal_i es el conjunto de datos de PCR de un elemento óptico, XTSeñal_i es el conjunto de datos de interferencia de un elemento óptico, r es una distancia (del inglés *offset*) común, s es una pendiente común y en el que q1, q2 y q3 son factores multiplicadores de ganancia.

5. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que minimizar la suma de los cuadrados incluye utilizar una ecuación de forma:

$$\min [\sum_i (\text{SeñalXT}_i - (r+s*i + q*\text{Señal}_i))^2]$$

en la que i es el número de ciclos de PCR, Señal_i es el conjunto de datos de PCR de un elemento óptico, XTSeñal_i es el conjunto de datos de interferencia de un elemento óptico, r es una distancia (del inglés *offset*), s es una pendiente y en el que q es un factor multiplicador de ganancia.

6. El método de la reivindicación 1, que también incluye:

-determinar una línea basal para cada conjunto de datos de PCR y cada conjunto de datos de interferencia; y
 -previamente a la determinación de los coeficientes de interferencia, sustraer la respectiva línea basal de cada conjunto de datos.

7. El método de la reivindicación 1, que también incluye:

-aplicar los coeficientes de interferencia determinados al conjunto de datos de PCR utilizando un modelo de sustracción lineal para obtener un conjunto de datos corregidos para la interferencia.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el modelo de sustracción lineal incluye una ecuación de forma:

$$f_{iC} = f_i - \left(\sum_{j \neq i} a_{ij} f_j \right)$$

en la que f_i es la señal medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia del canal (i), y en la que los coeficientes a_{ij} indican los coeficientes de interferencia del canal (j) en el canal (i).

9. El método de la reivindicación 7, en el que el modelo de sustracción lineal incluye una ecuación de forma:

$$f_{iC} = f_i - \left(\sum_{j \neq i} a_{ij} f_j \right) - (r + s * i)$$

5 en la que f_i es la señal medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia del canal (i), y en la que los coeficientes a_{ij} indican los coeficientes de interferencia del canal (j) en el canal (i), y r y s son una ganancia y un término lineal, respectivamente, que son comunes para todos los canales (i).

10 10. El método de la reivindicación 7, en el que el modelo de sustracción lineal incluye una ecuación de forma:

$$f_{iC} = f_i - \left(\sum_{j \neq i} a_{ij} f_j \right) - (r_i + s_i * i)$$

en la que f_i es la señal medida en el canal (i) y f_{iC} es la señal corregida para la interferencia del canal (i), y los coeficientes a_{ij} indican los coeficientes de interferencia del canal (j) en el canal (i), y en la que r_i y s_i son una ganancia y un término lineal, respectivamente, que son diferentes para cada canal (i)..

15 11. Un medio legible por computador que incluye un código para controlar un procesador para determinar los coeficientes de interferencia de un sistema de detección óptica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con al menos dos elementos ópticos, en los que cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango específico de longitudes de onda electromagnética diferentes, cuyo código incluye instrucciones para:

20 -recibir, para cada elemento óptico, un conjunto de datos de PCR adquirido a lo largo de un rango de adquisición de un proceso de crecimiento de PCR, cuyo rango de adquisición incluye una región de línea basal, una región de crecimiento y una región meseta;

25 -simultáneamente recibir, para cada uno de los demás elementos ópticos, un conjunto de datos de interferencia para cada filtro producido por el solapamiento de al menos dos espectros de colorantes en al menos dos rangos de filtro, y dicho conjunto de datos de interferencia se adquiere a lo largo del rango de adquisición; y

30 -determinar los coeficientes de interferencia utilizando los conjuntos de datos de PCR y de interferencia a lo largo del rango de adquisición, en el que determinar los coeficientes de interferencia incluye minimizar la suma de los cuadrados o los valores absolutos de las diferencias entre el conjunto de datos de PCR y el conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición.

35 12. Un sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cinética que comprende:

-un módulo de detección óptica con al menos dos elementos ópticos, en el que cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango diferente de longitudes de ondas electromagnéticas específico, y cuyo módulo de detección óptica está adaptado para:

40 -adquirir, para cada elemento óptico, un conjunto de datos de PCR a lo largo de un rango de adquisición de un proceso de crecimiento de PCR, en el que el rango de adquisición incluye una región de línea basal, una región de crecimiento y una región meseta; y

45 -simultáneamente adquirir, para cada uno de los demás elementos ópticos, un conjunto de datos de interferencia producidos por el solapamiento de menos dos espectros de colorante en al menos dos rangos de filtro, cuyo conjunto de datos de interferencia se adquiere a lo largo del rango de adquisición; y

50 -un módulo de inteligencia adaptado para procesar el conjuntos de datos de PCR adquiridos y los conjuntos de datos de interferencia para determinar los coeficientes de interferencia utilizando los conjuntos de datos de PCR y de interferencia a lo largo del rango de adquisición, y en el que el módulo de inteligencia determina los coeficientes de interferencia minimizando la suma de los cuadrados o los valores absolutos de las diferencias entre cada conjunto de datos de PCR y conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición.

55 13. Un sistema de análisis de fusión de ácidos nucleicos, que comprende:

-un módulo de detección óptica con al menos dos elementos ópticos, en el que cada elemento óptico puede utilizarse para aislar un rango diferente de longitudes de ondas electromagnéticas específico, y cuyo módulo de detección óptica está adaptado para:

- 5
- adquirir, para cada elemento óptico, un conjunto de datos de fusión a lo largo de un rango de adquisición de temperatura; y simultáneamente adquirir, para cada uno de los demás elementos ópticos, un conjunto de datos de interferencia producidos por el solapamiento de menos dos espectros de colorante en al menos dos rangos de filtro, cuyo conjunto de datos de interferencia se adquiere a lo largo del rango de adquisición de temperatura; y
 - determinar los coeficientes de interferencia minimizando la suma de los cuadrados entre cada conjunto de datos de fusión y cada conjunto de datos de interferencia a lo largo del rango de adquisición.

Figura 1A

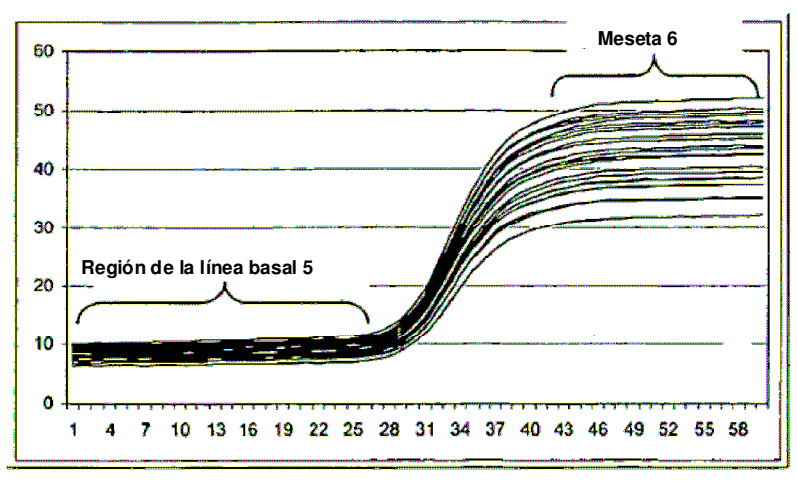


Figura 1B

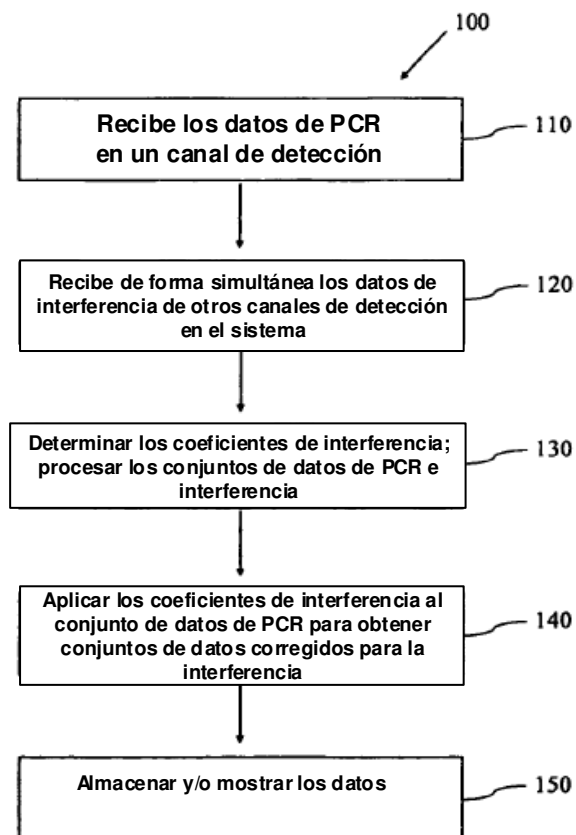


Figura 2

FAM

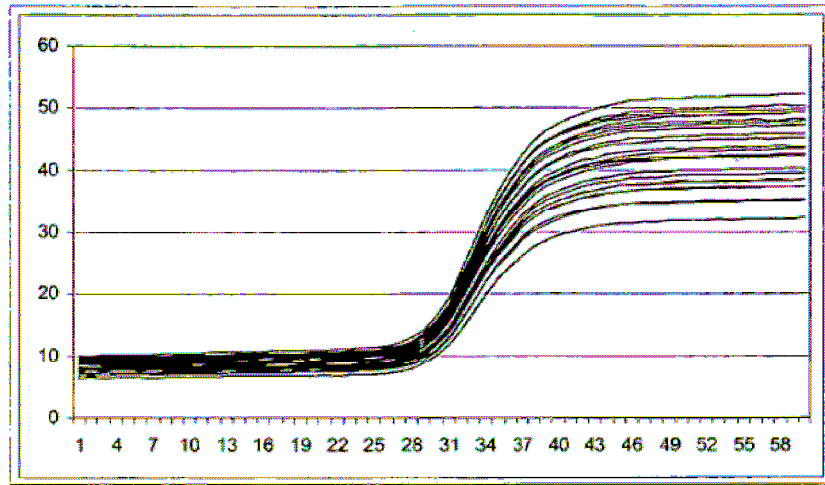


Figura 2A

HEX

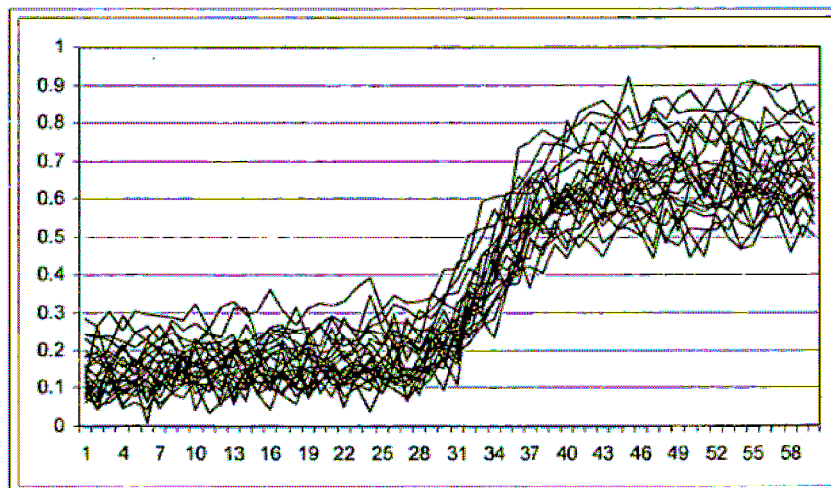


Figura 2B

Figura 4 (parte 1)

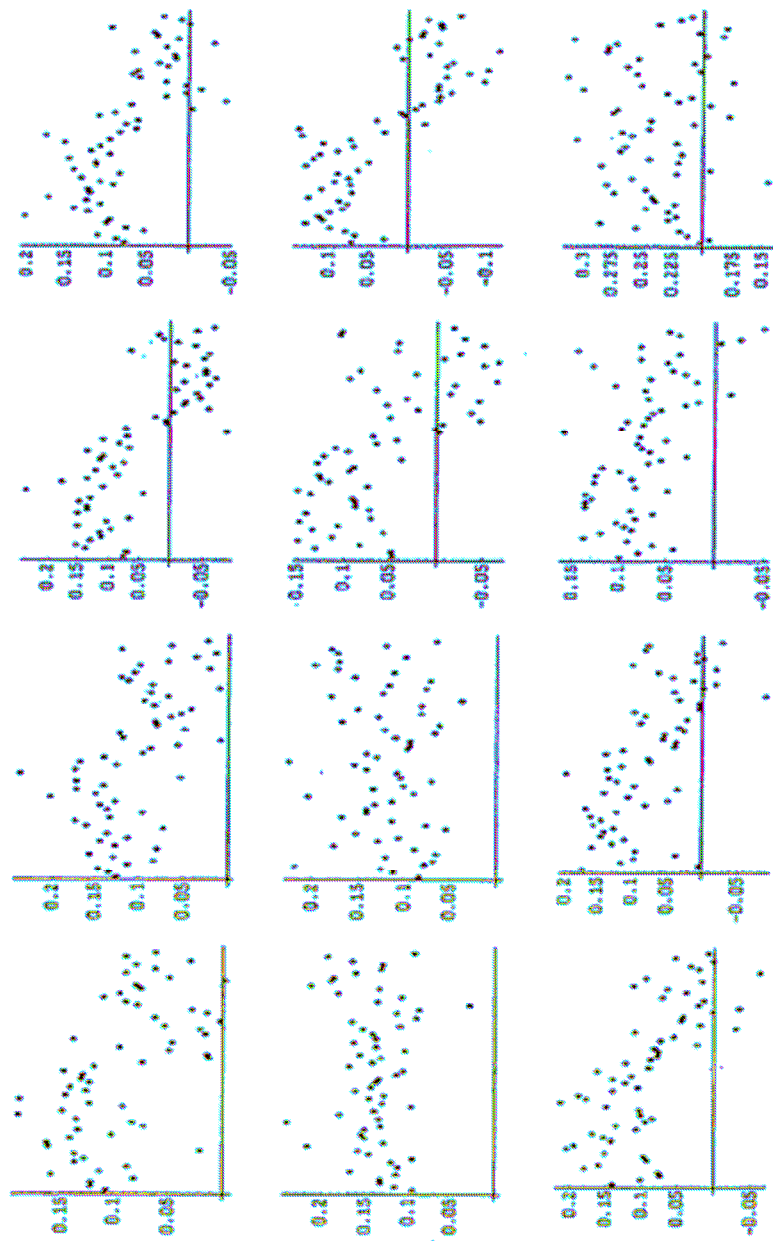


Figura 4 (parte 2)

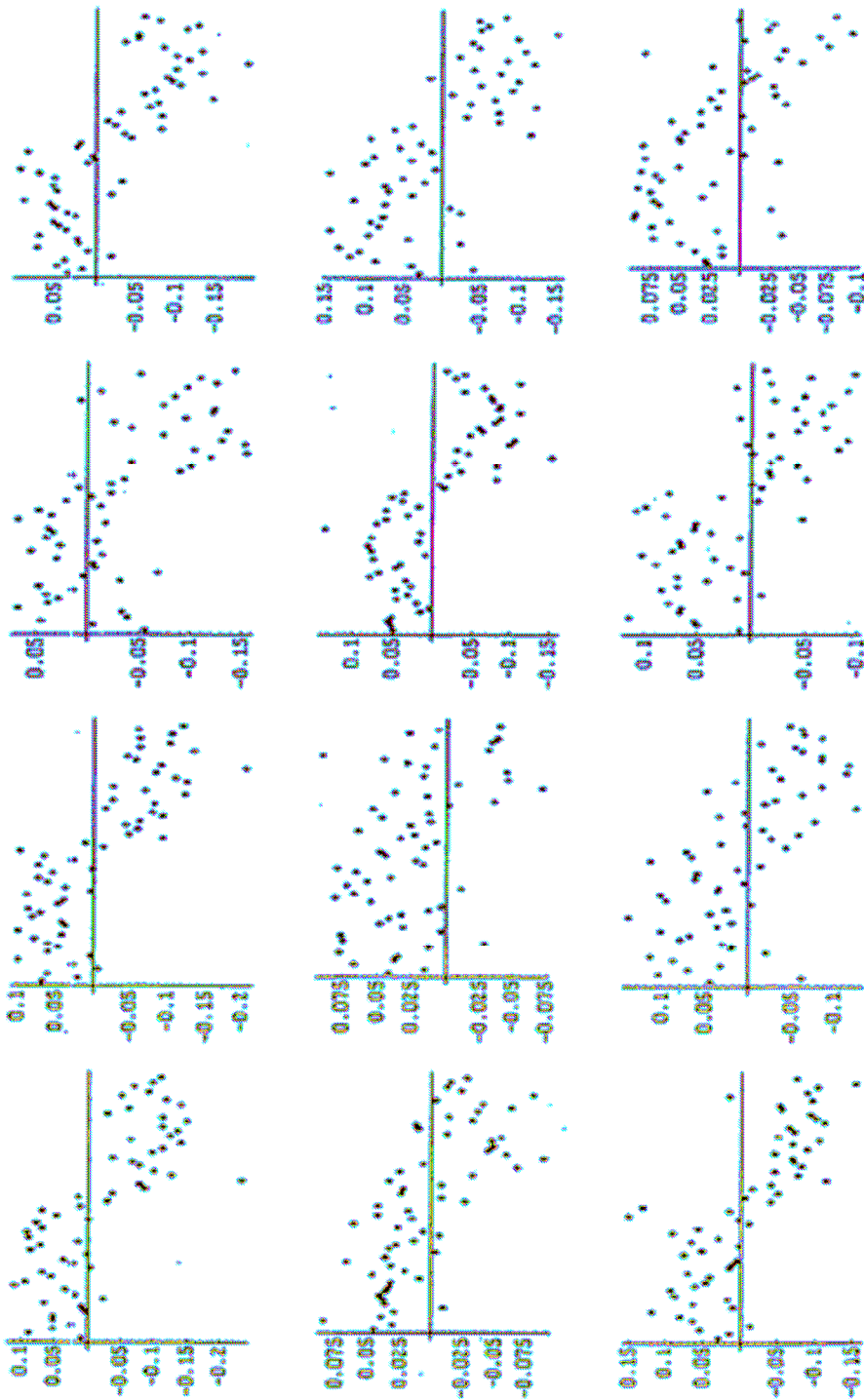


Figura 5

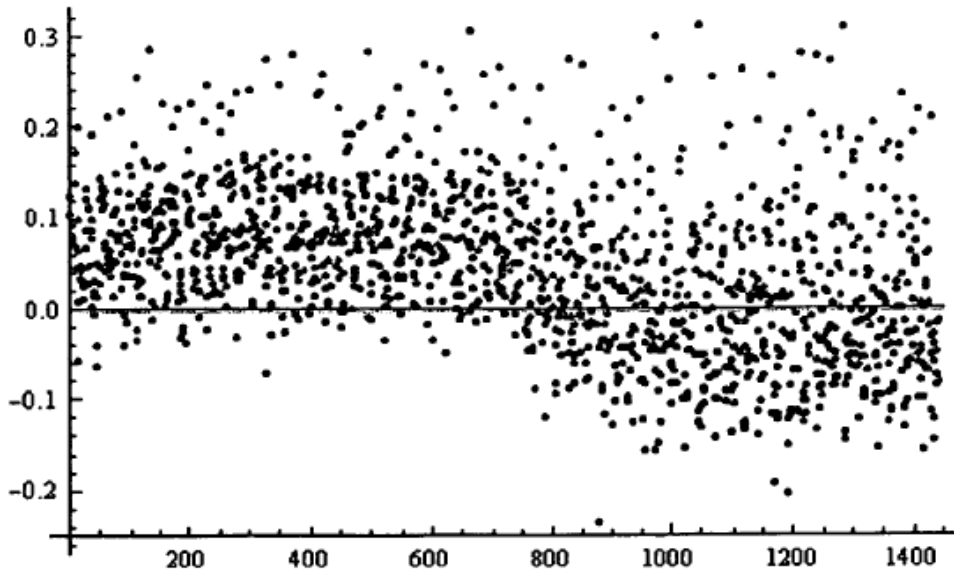


Figura 6

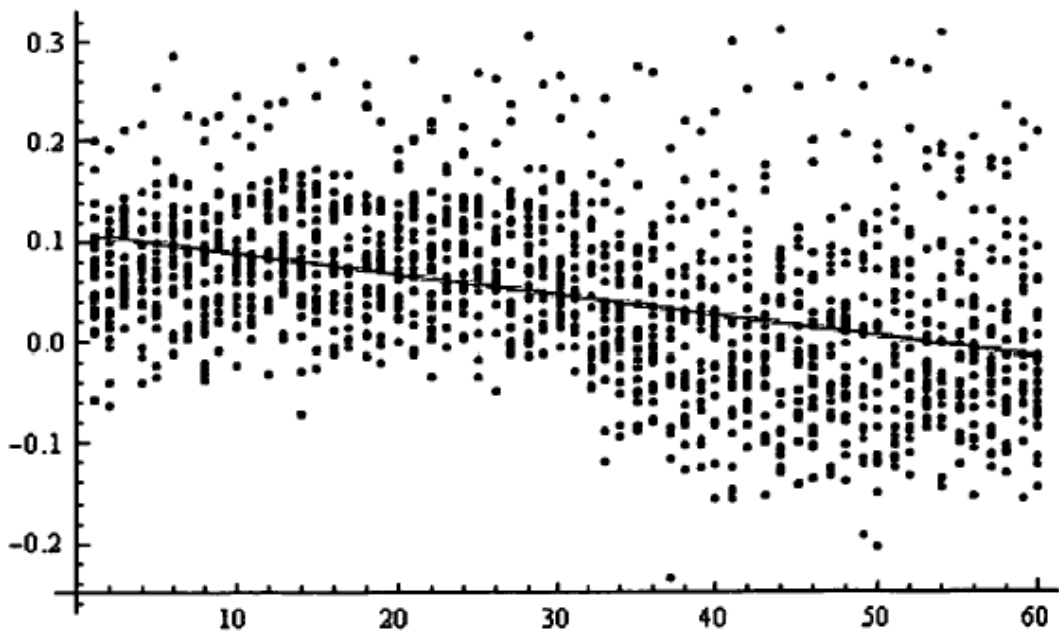


Figura 7

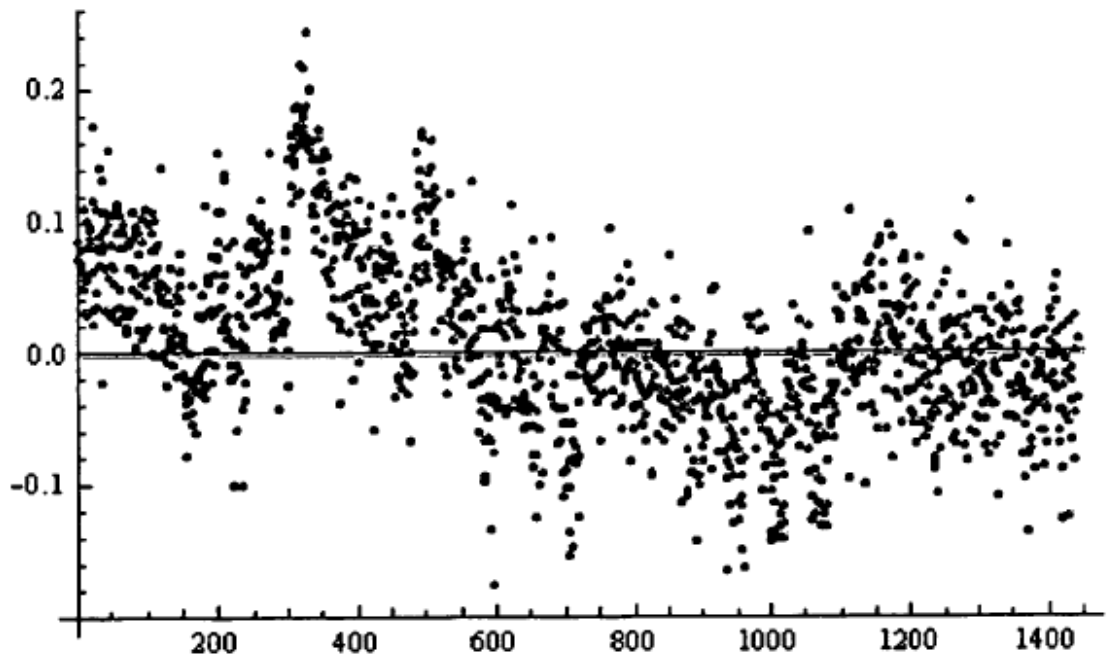


Figura 8

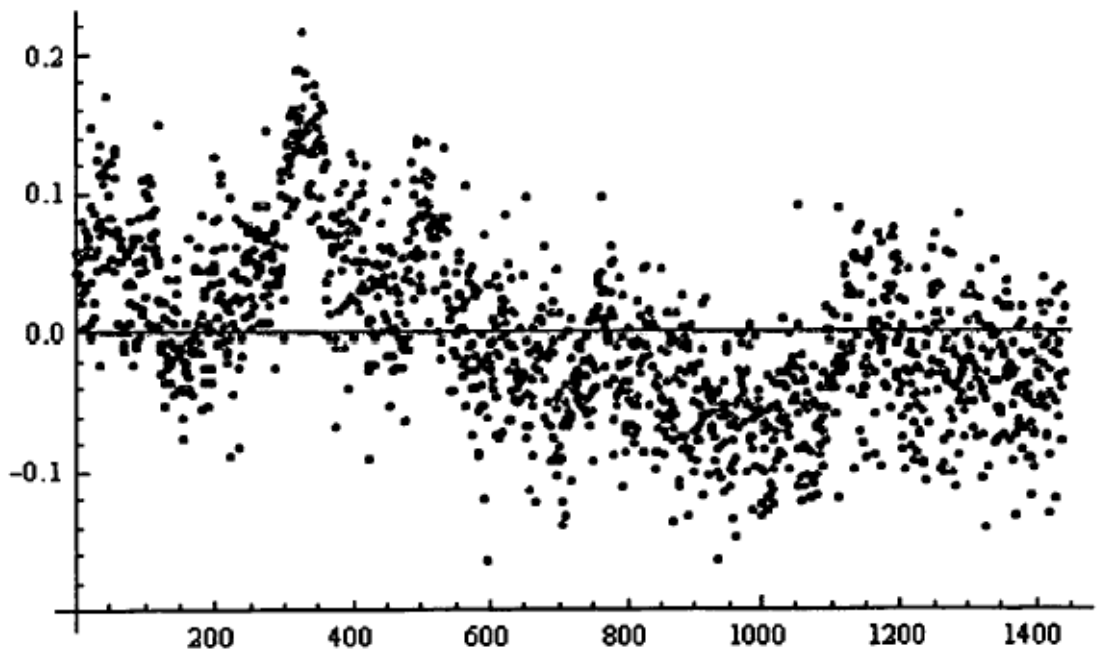


Figura 9

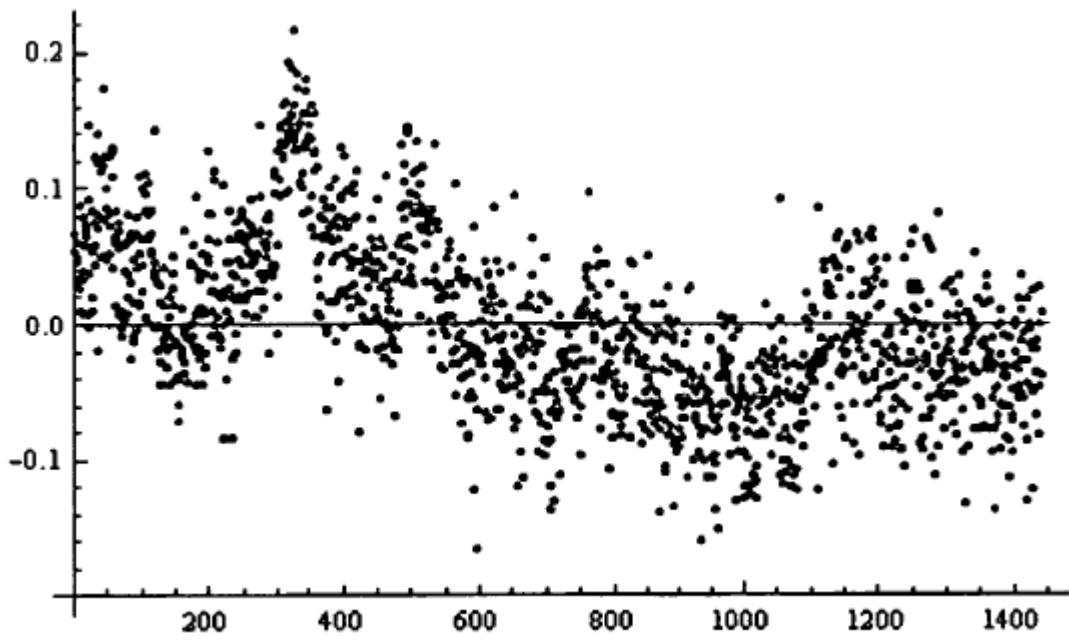


Figura 10

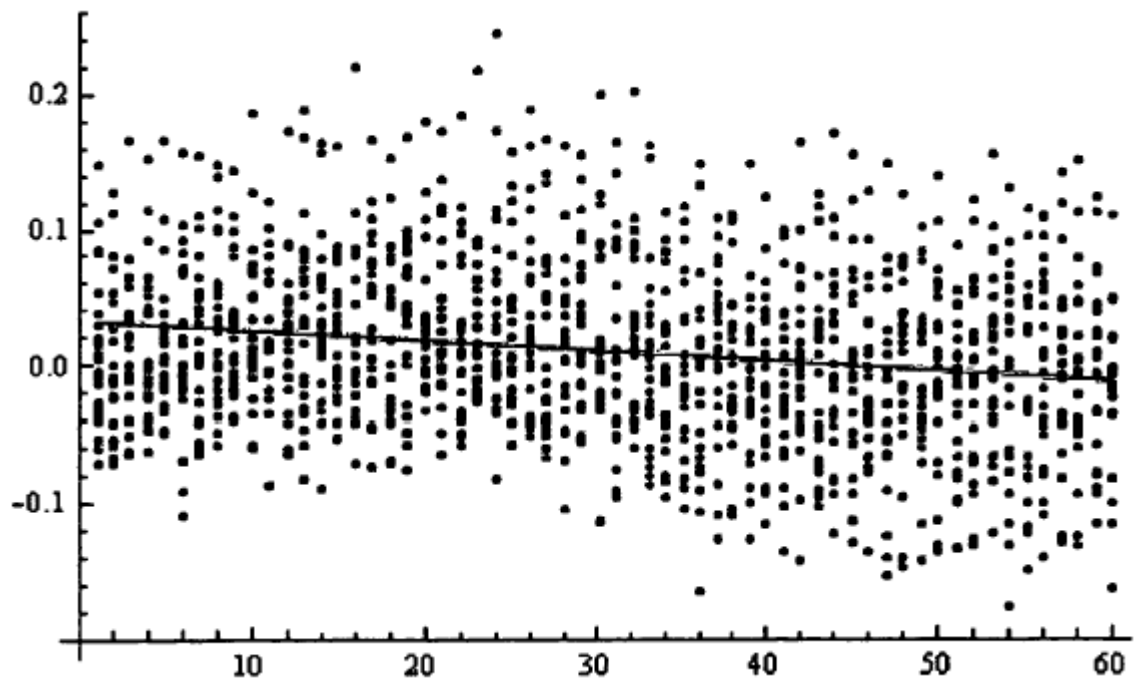


Figura 11

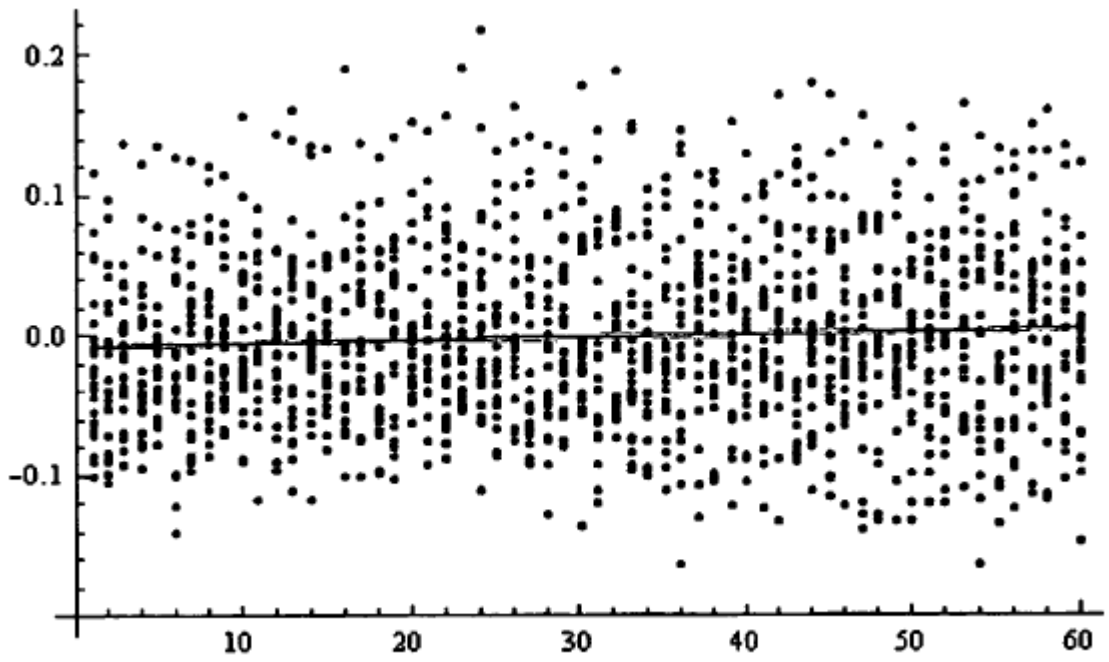


Figura 12

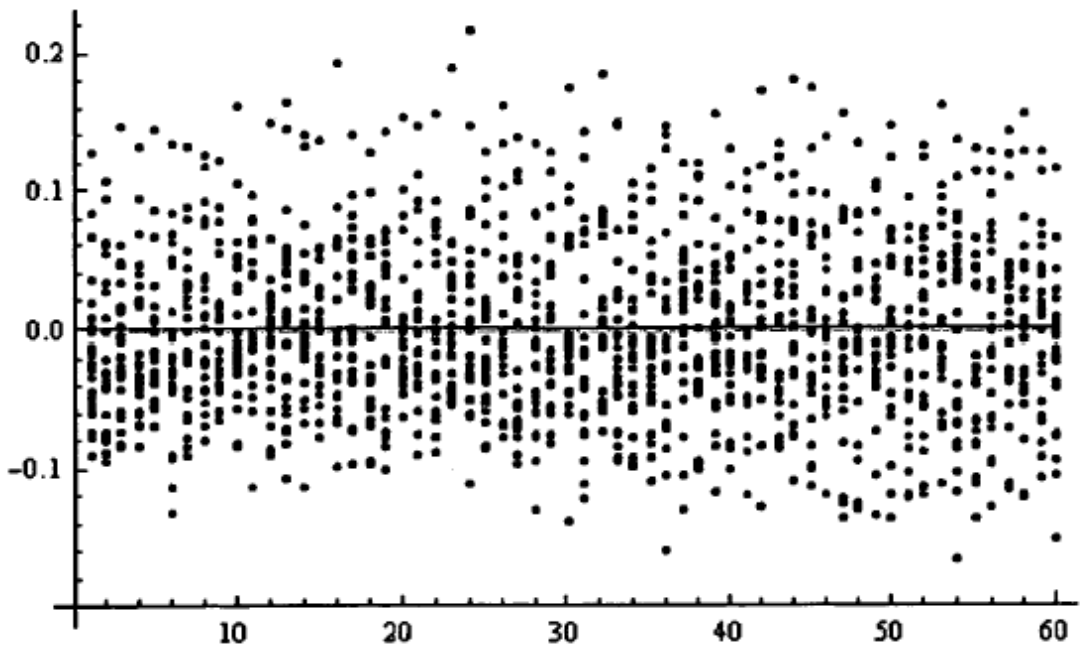
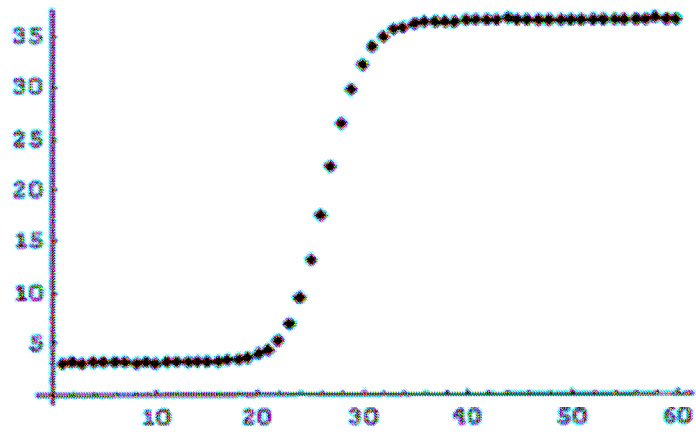
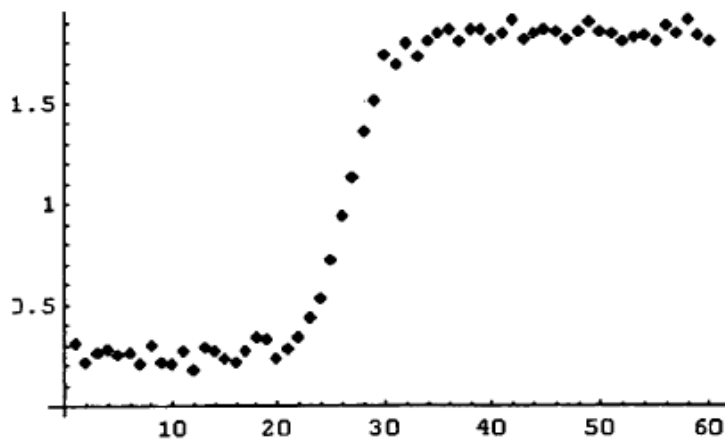


Figura 13



HIV en el canal FAM

Figura 14



Interferencia de HIV en el canal HEX

Figura 15

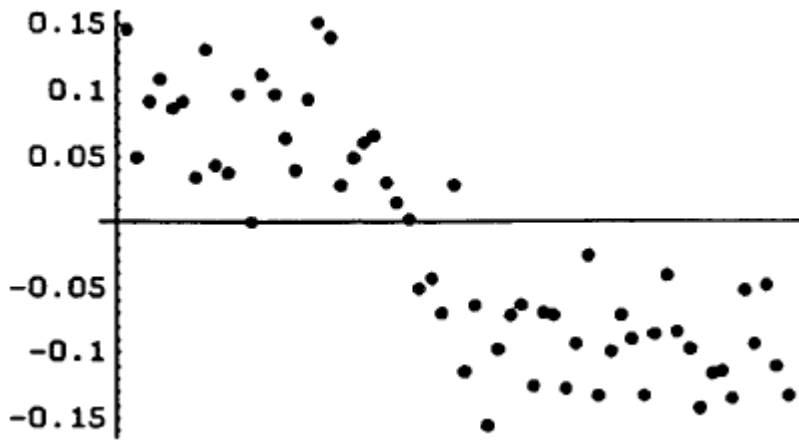


Figura 16

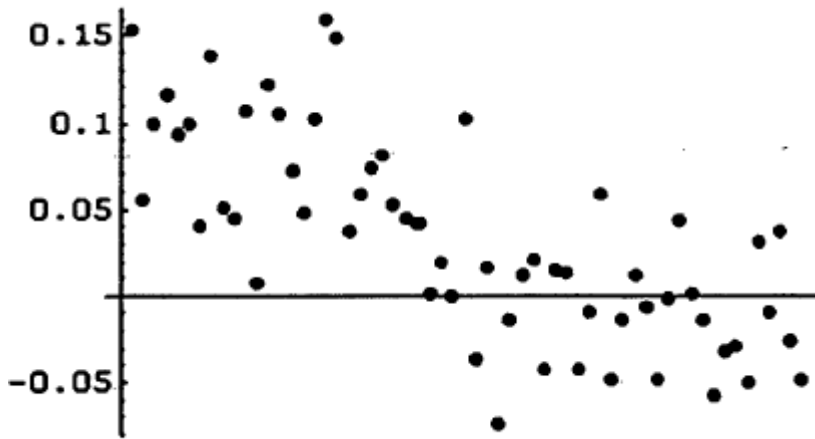


Figura 17

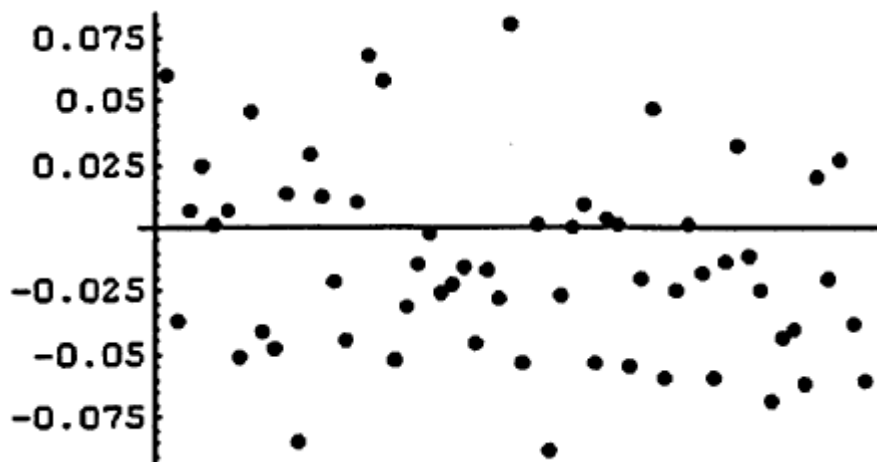


Figura 18

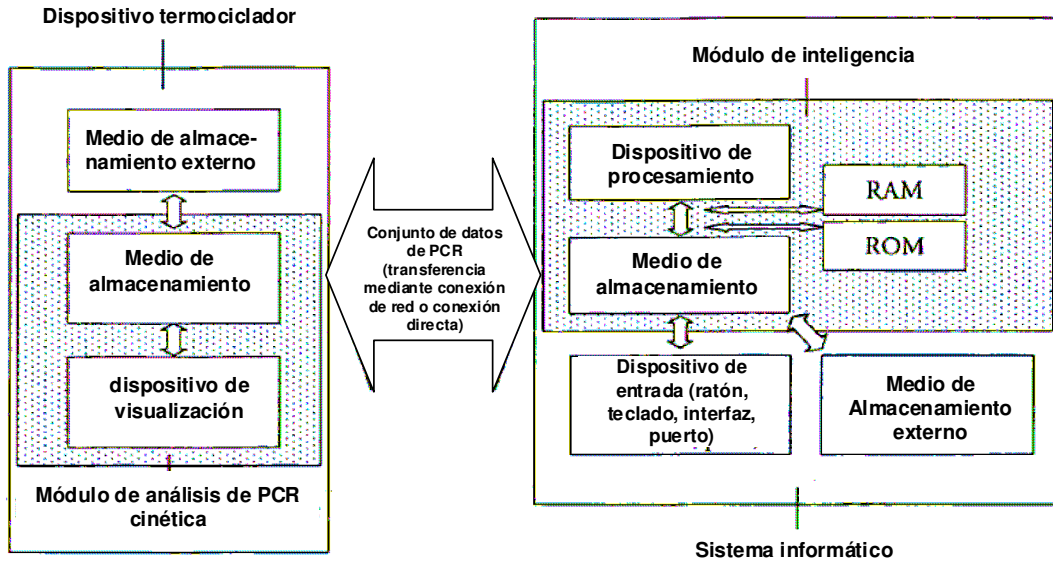


Figura 3

