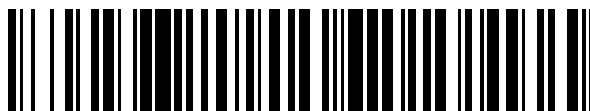


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 599**

51 Int. Cl.:

G01N 35/02 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

B01L 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012** **PCT/US2012/033667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012** **WO2012142516**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012** **E 12718504 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016** **EP 2697657**

54 Título: **Termociclador microfluídico de exploración en tiempo real y métodos para termociclado sincronizado y detección óptica de exploración**

30 Prioridad:

15.04.2011 US 201161476175 P

15.04.2011 US 201161476167 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.06.2017

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)

1 Becton Drive

Franklin Lakes, NJ 07417, US

72 Inventor/es:

GUBATAYAO, THOMAS, CATALINO;

HANDIQUE, KALYAN;

GANESAN, KARTHIK y

DRUMMOND, DANIEL, M.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 617 599 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

Termociclador microfluídico de exploración en tiempo real y métodos para termociclado sincronizado y detección óptica de exploración

Campo técnico

Los sistemas y métodos descritos en este documento se refieren en general a la ejecución automatizada de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la reacción de la cadena de polimerasa (PCR), y en algunos casos PCR en tiempo real, en una pluralidad de cámaras de reacción de microfluidos en un cartucho de microfluidos. El sistema puede detectar posteriormente ácidos nucleicos objetivo, por ejemplo, los amplicones objetivo, dentro de cada una de las cámaras de reacción.

Antecedentes de la invención

La industria del diagnóstico médico es un elemento fundamental de la infraestructura actual de la salud. En la actualidad, sin embargo, los análisis de diagnóstico in vitro, no importa cuán rutinarios sean, se han convertido en un cuello de botella en el cuidado del paciente. Hay varias razones para esto. En primer lugar, muchos análisis de diagnóstico solo se pueden hacer con un equipo altamente especializado que es caro y solo podrá ser operado por los médicos entrenados. Dichos equipos pueden encontrarse en solo unos pocos lugares - a menudo solo uno en cualquier área urbana determinada. Esto requiere que los hospitales envíen muestras para su análisis a estos lugares, lo que origina gastos de envío y retrasos en el transporte, y posiblemente incluso la pérdida o mal manejo de la muestra. En segundo lugar, el equipo en cuestión por lo general no está disponible "a pedido", sino que se ejecuta en lotes, lo que retrasa el tiempo de procesamiento para muchas muestras, ya que deben esperar a que una máquina alcance la capacidad antes de que se puedan ejecutar.

La comprensión de que los ensayos de diagnóstico de muestras biológicas, se pueden partir en varias etapas clave, a menudo es deseable para automatizar una o más etapas. Por ejemplo, una muestra biológica, tales como las obtenidas de un paciente, se puede utilizar en los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, con el fin de amplificar un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, ADN, ARN, o similares) de interés. Una vez amplificado, la presencia de un reactor de ácido nucleico objetivo, o producto de amplificación de un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, un amplicón objetivo) puede ser detectado, en el que la presencia de un ácido nucleico objetivo y/o amplicón objetivo se utiliza para identificar y/o cuantificar la presencia de un objetivo (por ejemplo, un microorganismo objetivo o similares). A menudo, los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos implican varias etapas, que pueden incluir la extracción de ácido nucleico, la amplificación de ácido nucleico, y la detección. Es deseable automatizar ciertas etapas de estos procesos.

El documento US 2009/0130745 A1 divulga un sistema de microfluidos que lleva a cabo la PCR en múltiples muestras de nucleótidos de interés dentro de los canales de microfluidos, y detecta los nucleótidos. El documento US 6236456 B1 divulga un método y un aparato para determinar la fluorescencia, la luminiscencia o la absorción de una muestra. El documento WO 2008/030914 se refiere a un dispositivo para llevar a cabo reacciones químicas o biológicas con un elemento de recepción del recipiente de reacción para recibir una placa de microtitulación con varios recipientes de reacción, donde el elemento receptor del recipiente de reacción se divide en varios segmentos. El documento 2004/0224317 A1 describe un aparato de detección de fluorescencia para el análisis de muestras situadas en una pluralidad de pocillos en un termociclador.

Hay una necesidad de un método y un aparato para llevar a cabo ensayos de diagnóstico molecular en muestras múltiples en paralelo, con o sin amplificación de los ácidos nucleicos objetivo, y la detección en muestras biológicas preparadas. El sistema puede ser configurado para un alto rendimiento, y la operación en un laboratorio de referencia comercial o en el punto de atención, lo que elimina la necesidad de enviar la muestra a un centro especializado.

Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona un sistema para realizar ensayos de diagnóstico molecular en muestras múltiples en paralelo, comprendiendo el sistema:

una pluralidad de cámaras de reacción;
un cabezal de detección que comprende una pluralidad de pares de fotodetector y fuente de luz para realizar detecciones de dicha pluralidad de cámaras de reacción;
un procesador configurado para llevar a cabo lo siguiente:

determinar o proporcionar o acceder a un tiempo de ciclo de detección, el tiempo de ciclo de detección siendo la cantidad de tiempo requerida para realizar una pluralidad predeterminada de detecciones por dicho cabezal de detección en dicha pluralidad de cámaras de reacción;

recibir o acceder a una etapa de protocolo de un protocolo, la etapa teniendo una duración de etapa asociada con ella, la etapa comprendiendo un tiempo en el que la detección se producirá durante la etapa; y la determinación de un primer ajuste de la etapa de tal manera que la duración de la etapa es un múltiplo entero del tiempo de ciclo de detección.

5 La presente invención proporciona además un método para realizar simultáneamente PCR en tiempo real en una pluralidad de cámaras de reacción de PCR, que comprende:

- 10 (a) proporcionar un tiempo de exploración suficiente para un conjunto de detector para realizar un ciclo de escaneo durante el cual se puede escanear cada una de la pluralidad de cámaras de reacción de PCR para la al menos una señal detectable y estar listo para repetir la exploración;
- (b) proporcionar un protocolo de reacción para cada una de las cámaras de reacción de PCR que incluye múltiples ciclos, comprendiendo cada ciclo una duración de ciclo que incluye al menos una etapa de calentamiento, al menos una etapa de enfriamiento, y al menos una meseta de temperatura, que incluye un
- 15 período de ciclo de lectura durante el cual el conjunto de detección explora la cámara de reacción para al menos una señal detectable;
- (c) determinar, usando un procesador, si el tiempo de ciclo para la cámara de reacción es el mismo que o un múltiplo entero del tiempo de exploración, y si no, ajustar el tiempo de ciclo de manera que el tiempo de ciclo es el mismo que o un número entero múltiplo del tiempo de exploración;
- 20 (d) realizar al menos las etapas (b) y (c) para el protocolo de reacción para cada una de la pluralidad de cámaras de reacción de PCR de modo que el tiempo de ciclo para cada protocolo de reacción es el mismo o un múltiplo entero del tiempo de exploración; y
- (e) bajo la dirección de un procesador, realizar la PCR en tiempo real en cada una de las cámaras de reacción utilizando el protocolo de reacción para cada una de las cámaras de reacción, incluyendo la realización de
- 25 múltiples ciclos de exploración con el conjunto de detector, en el que cada cámara de reacción PCR es explorada por el conjunto detector durante cada período de ciclo de lectura para esa cámara de reacción.

Las realizaciones descritas en este documento se refieren a métodos y dispositivos para el ensayo simultáneo de múltiples muestras. Ciertas realizaciones contemplan un aparato para realizar la amplificación y la detección del

30 ácido nucleico en tiempo real. El aparato puede incluir un cabezal de detección que comprende una pluralidad de pares de fotodetector y fuente de luz. El cabezal detector se puede montar en un carril, en el que los pares de detector y fuente de luz están alineados en una primera fila y una segunda fila. El aparato puede incluir un receptáculo para un cartucho de microfluidos que tiene una pluralidad de cámaras de reacción independientes alineadas en columnas adyacentes de una primera fila y una segunda fila. El aparato también puede incluir una

35 placa de apertura que está configurada para ser posicionada sobre el cartucho de microfluidos cuando el cartucho está presente en el receptáculo. La placa de abertura puede incluir una pluralidad de aberturas que están alineadas cada una sobre cada una de la pluralidad de cámaras de reacción cuando el receptáculo está sosteniendo el cartucho de microfluidos. El cabezal detector puede estar situado sobre la placa de abertura, y ser móvil a lo largo del carril, de manera que cada uno de la pluralidad de pares de fotodetector y fuente de luz en la primera fila se

40 puede colocar encima de cada abertura en la primera fila de la placa de abertura, y cada uno de la pluralidad de pares de fotodetector y fuente de luz en la segunda fila se puede colocar encima de cada abertura en la segunda fila de la placa de abertura.

En algunas realizaciones, el aparato incluye también un segundo cabezal de detección que tiene una pluralidad de

45 pares de fotodetector y fuente de luz alineados en una primera fila y una segunda fila. El segundo cabezal del detector puede estar montado sobre el carril. El aparato puede incluir también un segundo receptáculo para un cartucho de microfluidos que incluye una pluralidad de cámaras de reacción independientes alineadas en columnas adyacentes de una primera fila y una segunda fila. El aparato también puede incluir una segunda placa de abertura configurada para ser colocada sobre el segundo cartucho de microfluidos cuando el segundo cartucho está presente

50 en el segundo recipiente, y que puede incluir una pluralidad de aberturas que están cada una alineada sobre cada una de la pluralidad de cámaras de reacción del segundo cartucho de microfluidos cuando el segundo recipiente está sosteniendo el segundo cartucho de microfluidos. El segundo cabezal de detección puede estar situado sobre la placa de abertura, y puede ser desplazable a lo largo del carril de tal manera que cada uno de la pluralidad de pares de fotodetector y fuente de luz en la primera fila del segundo cabezal del detector se puede colocar encima de

55 cada abertura en la primera fila de la segunda placa de abertura, y cada uno de la pluralidad de pares de fotodetector y fuente de luz en la segunda fila del segundo cabezal de detección se puede colocar encima de cada abertura en la segunda fila de la segunda placa de abertura.

En algunas realizaciones, los pares de fotodetectores y la fuente de luz puede incluir al menos seis diferentes pares

60 de fotodetector y fuente luminosa que funcionan en seis longitudes de onda diferentes. En algunas realizaciones, las seis longitudes de onda diferentes comprenden una fuente de luz que emite una luz de color verde, una fuente de luz que emite una luz de color amarillo, una fuente de luz que emite una luz de color naranja, una fuente de luz que emite una luz de color rojo, y una fuente de luz que emite un rojo de color claro. En algunas realizaciones, la cabeza de detección incluye al menos N filas de pares de fotodetector y fuente de luz y el detector está configurado para

65 mover al menos $M + N - 1$ posiciones sobre una placa de abertura que comprende M filas de aberturas.

En algunas realizaciones, la placa de abertura comprende acero, aluminio, níquel, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la placa de abertura puede tener un espesor de aproximadamente 0,25 pulgadas (6,35 mm). En algunas realizaciones, al menos parte de la placa de abertura se oxida electroquímicamente a ser más oscura que cuando la placa de abertura no se oxida electroquímicamente. En algunas realizaciones, la placa de

5

abertura proporciona una presión sustancialmente uniforme a través del área del cartucho de microfluidos, cuando el cartucho está presente dentro del receptáculo. En algunas realizaciones, la placa de abertura comprende al menos uno de aluminio, zinc o níquel, la placa de abertura comprende además un colorante.

En algunas realizaciones, el aparato comprende además una placa de calefacción, en el que la placa de calefacción está colocada debajo del cartucho de microfluidos cuando un cartucho está presente en el receptáculo. En algunas realizaciones la placa de calefacción comprende al menos uno de vidrio o cuarzo. En algunas realizaciones, la placa de

10

15

abertura proporciona una presión sustancialmente uniforme a través del área del cartucho de microfluidos cuando un cartucho está presente dentro del receptáculo. La presión sustancialmente uniforme puede facilitar el contacto térmico sustancialmente uniforme entre las cámaras de reacción de microfluidos y la placa de calefacción. Como tal, en algunas realizaciones, la placa de abertura proporciona una presión uniforme que puede asegurar que cada uno de la pluralidad de cámaras de reacción o reactores en el cartucho de microfluidos están en contacto térmico uniforme o en comunicación con uno respectivo de una pluralidad de elementos de calentamiento situados dentro de la placa de calefacción.

En algunas realizaciones, el aparato comprende además un fotodetector, el fotodetector estando situado sobre la placa de abertura, en el que la cámara de microfluidos está configurada para recibir la luz en un ángulo oblicuo a partir de una fuente de luz en relación con el fotodetector. En algunas realizaciones, la placa de calefacción comprende una pluralidad de elementos de calentamiento, en el que cada uno de la pluralidad de elementos de calentamiento están situados de manera que cuando el cartucho de microfluidos está presente en el receptáculo, la

20

25

pluralidad de elementos de calentamiento está en conexión térmica con cada una de la pluralidad de cámaras de reacción, respectivamente.

Ciertas realizaciones contemplan un método implementado en uno o más procesadores de ordenador para la optimización de protocolos, tales como los protocolos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o similares, para realizar simultáneamente una pluralidad de reacciones de ciclo térmico, en el que cada reacción de ciclado térmico comprende una o más etapas de detección, y en el que las reacciones de ciclado térmico se llevan a cabo en una pluralidad de reactores. El método puede incluir las etapas de determinar o proporcionar o acceder a un tiempo de ciclo de detección para cada uno de la pluralidad de reactores; recibir o acceder a una etapa de protocolo, la etapa asociada con una duración de etapa, la etapa comprendiendo un tiempo para la detección; y la determinación de un primer ajuste de la etapa de tal manera que la duración de la etapa es un múltiplo del tiempo del ciclo de detección.

30

35

En algunas realizaciones el método comprende además determinar un segundo ajuste en la etapa, en el que el tiempo para la detección es un múltiplo del tiempo de ciclo de detección cuando la etapa se ajusta con el primer ajuste y el segundo ajuste. En algunas realizaciones el método comprende además determinar un desplazamiento inicial de ajuste sobre la base de una posición de una cámara de reacción asociada con el protocolo. En algunas realizaciones, el tiempo de ciclo de detección comprende la cantidad de tiempo requerido para que un cabezal de detección para realizar una pluralidad predeterminada de detecciones para un reactor. En algunas realizaciones, el tiempo de ciclo de detección incluye un tiempo requerido para el movimiento del cabezal de detección para cada uno de una pluralidad de reactores y el movimiento del cabezal de detección a la posición inicial. En algunas realizaciones, el método comprende además iniciar el protocolo.

40

45

Ciertas realizaciones contemplan un medio legible por ordenador no transitorio que comprende instrucciones, las instrucciones estando configuradas para causar uno o más procesadores para llevar a cabo las siguientes etapas: determinar o proporcionar o acceder a un tiempo de ciclo de detección; recibir o acceder a una etapa de protocolo, en la que la etapa está asociada con una duración de la etapa, y la etapa en la que incluye un tiempo para la detección; y la determinación de un primer ajuste de la etapa de tal manera que la duración de la etapa es un múltiplo del tiempo de ciclo de detección.

50

En algunas realizaciones, la etapa de protocolo se asocia con un protocolo de una pluralidad de protocolos. Cada uno de la pluralidad de protocolos puede estar asociado con al menos una de una pluralidad de reacciones de ciclo térmico, tales como protocolos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que cada reacción de ciclado térmico comprende una o más etapas de detección, y en el que la determinación de un primer ajuste se basa al menos en parte en un tiempo de una o más etapas de detección asociadas con las reacciones de ciclado térmico de al menos dos o más de la pluralidad de protocolos cuando los dos o más de la pluralidad de protocolos se ejecutan simultáneamente. En algunas realizaciones, el método incluye también la etapa de determinar un segundo ajuste en la etapa, en el que el tiempo para la detección es un múltiplo del tiempo de ciclo de detección cuando la etapa se ajusta con el primer ajuste y el segundo ajuste. En algunas realizaciones, el método incluye también la etapa de determinar un ajuste del desplazamiento de inicio sobre la base de una posición de una cámara de reacción asociada con el protocolo. En algunas realizaciones, el tiempo de ciclo de detección incluye la cantidad de tiempo requerido para que un cabezal de detección para realizar una pluralidad predeterminada de detecciones de una

55

60

65

cámara de reacción. En algunas realizaciones, el tiempo de ciclo de detección incluye también un tiempo requerido para el movimiento del cabezal de detección para cada una de una pluralidad de posiciones de detección de la cámara de reacción y el movimiento del cabezal de detección a una posición de inicio. En algunas realizaciones, el método comprende además iniciar el protocolo.

Ciertas realizaciones contemplan un sistema para la optimización de protocolos para una pluralidad de cámaras de reacción. El sistema puede incluir un procesador configurado para realizar lo siguiente: determinar o proporcionar o acceder a un tiempo de ciclo de detección; recibir o acceder a una etapa de protocolo, en la que la etapa puede estar asociada con una duración de la etapa, y en el que la etapa incluye un tiempo para la detección; y la determinación de un primer ajuste de la etapa de tal manera que la duración de la etapa es un múltiplo del tiempo de ciclo de detección.

En algunas realizaciones, la etapa de protocolo se asocia con un protocolo de una pluralidad de protocolos. Cada uno de la pluralidad de protocolos puede estar asociado con al menos una de una pluralidad de reacciones de ciclo térmico, como un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que cada reacción de ciclo térmico comprende una o más etapas de detección, y en el que la determinación de un primer ajuste se basa al menos en parte en un tiempo de una o más etapas de detección asociadas con las reacciones de ciclo térmico de al menos dos o más de la pluralidad de protocolos cuando los dos o más de la pluralidad de protocolos se ejecutan simultáneamente. En algunas realizaciones, el procesador también está configurado para determinar un segundo ajuste en la etapa, en el que el tiempo para la detección es un múltiplo del tiempo de ciclo de detección cuando la etapa se ajusta con el primer ajuste y el segundo ajuste. En algunas realizaciones, el procesador también está configurado para determinar un ajuste del desplazamiento de partida sobre la base de una posición de una cámara de reacción asociada con el protocolo. En algunas realizaciones, el tiempo de ciclo de detección incluye la cantidad de tiempo requerido para que un cabezal de detección realice una pluralidad predeterminada de detecciones de una cámara de reacción. En algunas realizaciones, el tiempo de ciclo de detección incluye también un tiempo requerido para el movimiento del cabezal de detección para cada una de una pluralidad de posiciones de detección de la cámara de reacción y el movimiento del cabezal de detección a la posición inicial. En algunas realizaciones, el procesador está configurado además para iniciar el protocolo.

Ciertas realizaciones contemplan un método para realizar simultáneamente una PCR en tiempo real en una pluralidad de cámaras de reacción de PCR, que comprende: (a) proporcionar un tiempo de exploración suficiente para un conjunto de detector para realizar un ciclo de exploración durante el cual se puede explorar cada una de la pluralidad de cámaras de reacción de PCR para la al menos una señal detectable y estar listo para repetir la exploración; (b) proporcionar un protocolo de reacción para cada una de las cámaras de reacción de PCR que incluye múltiples ciclos, comprendiendo cada ciclo una duración de ciclo que incluye al menos una etapa de calentamiento, al menos una etapa de enfriamiento, y al menos una meseta de temperatura que incluye un período de ciclo de lectura durante el cual el conjunto detector explora la cámara de reacción para al menos una señal detectable; (c) determinar, usando un procesador, si el tiempo de ciclo para la cámara de reacción es el mismo que o un múltiplo entero del tiempo de exploración, y si no, ajustando el tiempo de exploración o el tiempo de ciclo de manera que el tiempo de ciclo es el mismo que o un múltiplo entero del tiempo de exploración; (d) realizar al menos las etapas (b) y (c) para el protocolo de reacción para cada una de la pluralidad de cámaras de reacción de PCR de modo que el tiempo de ciclo para cada protocolo de reacción es el mismo o un múltiplo entero del tiempo de exploración; y (e) bajo la dirección de un procesador, la realización de PCR en tiempo real en cada una de las cámaras de reacción utilizando el protocolo de reacción para cada una de las cámaras de reacción, incluyendo la realización de múltiples ciclos de exploración con el conjunto de detección, en el que cada cámara de reacción de PCR es explorada por el conjunto de detección durante cada período del ciclo de lectura para esa cámara de reacción.

En algunas realizaciones, el método comprende además la fase de ajustar el tiempo de ciclo del protocolo de reacción para al menos una de las cámaras de reacción. En algunas realizaciones, al menos uno de dichos protocolos de reacción es diferente de otro dicho protocolo de reacción. En algunas realizaciones, al menos un tiempo de ciclo en un protocolo de reacción es diferente del tiempo de ciclo en el otro protocolo de reacción.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es una vista en planta frontal de un aparato de diagnóstico tal como se usa en algunas de las realizaciones.

La figura 1B es una vista en perspectiva desde arriba del aparato de diagnóstico de la figura 1A que muestra determinados componentes internos del aparato.

La figura 2 ilustra una vista del interior del aparato de diagnóstico de las figuras 1A y 1B.

La figura 3A ilustra una vista en planta superior de una posible disposición de microfluidos dentro de ciertos modos de realización de un cartucho de microfluidos como se describe en el presente documento.

La figura 3B ilustra la disposición de un sustrato calentador en relación con la cámara de reacción de algunas de las realizaciones.

La figura 4A ilustra una vista exterior del módulo óptico que incluye el cabezal de detección de algunas de las realizaciones descritas en este documento.

La figura 4B ilustra una vista del módulo óptico de la figura 4A con una cubierta lateral retirada.

La figura 4C ilustra una vista inferior del módulo óptico de la figura 4A.

La figura 5 ilustra un cabezal de detección utilizado en el módulo óptico de algunas de las realizaciones a lo largo de la línea 13 de la figura 4B.

La figura 6 representa la disposición de las fuentes de luz y los detectores ópticos tal como se usa en algunas de las realizaciones del cabezal de detección descritas en este documento.

La figura 7 es una gráfica de la fluorescencia en función del tiempo de uso de PCR en tiempo real de ácidos nucleicos objetivo realizado en un aparato de ciertas realizaciones como se describe aquí.

La figura 8 es una representación abstracta de algunas de las capas de cámara, la apertura y de calefacción que se encuentran en algunas de las realizaciones como se describe en el presente documento.

Las figuras 9A-H ilustran diversas perspectivas de una realización de la placa de abertura.

La figura 10 ilustra diversas dimensiones de las perspectivas de la placa de apertura de las figuras 9A-H.

La figura 11 es diagrama de una porción de un perfil térmico para un posible protocolo implementado en algunas de las realizaciones.

La figura 12 es un diagrama de flujo que representa un proceso para determinar las duraciones de protocolo, desplazamientos y tiempos de detección, a fin de optimizar y regular la eficiencia del detector.

La figura 13 ilustra una porción de una interfaz de usuario para la selección de duraciones de ciertas etapas de protocolo y etapas secundarias y la determinación del ajuste intra ciclo acompañante.

La figura 14 es un gráfico de un perfil térmico que comprende un ajuste entre ciclos.

Las figuras 15A-C grafican una pluralidad de perfiles térmicos para una pluralidad de protocolos implementados en algunas de las realizaciones. Las figuras 15A y 15B ilustran el carácter de los perfiles de protocolo antes del ajuste de desplazamiento inicial. La figura 15C ilustra la pluralidad de perfiles de protocolo entre sí después de aplicar los ajustes de desplazamiento inicial.

La figura 16 es diagrama de un perfil térmico bajo enfriamiento activo como se aplica en algunas de las realizaciones.

Descripción detallada

Algunas de las presentes realizaciones contemplan un aparato, denominado en este documento como un termociclador, que puede calentar de manera consistente y analizar cámaras de microfluidos. La amplificación de polinucleótidos, tal como mediante la PCR en tiempo real, se puede realizar dentro de las cámaras de microfluidos. En algunas realizaciones, el termociclador se puede configurar para realizar protocolos de termociclado y de detección individuales en una pluralidad de cámaras de reacción de microfluidos dentro de un cartucho de microfluidos. El termociclado se puede utilizar para amplificar ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN, ARN o similares, por ejemplo, mediante PCR en tiempo real u otros protocolos de amplificación de ácido nucleico descritos en este documento, dentro de las cámaras de reacción de microfluidos. El termociclador puede comprender un cabezal detector, que comprende una pluralidad de pares de detectores, por ejemplo, seis o más pares de cabezales de detección, en el que cada par de detectores comprende una fuente de emisión de luz, por ejemplo, un LED o similar, y un fotodiodo similar. En algunas realizaciones, cada par detector individual está configurado para generar y detectar la luz emitida desde un resto fluorescente, por ejemplo, una sonda fluorescente, para indicar la presencia de un polinucleótido objetivo.

Tal como se utiliza aquí, el término "microfluidos" se refiere a los volúmenes de menos de 1 ml, preferiblemente menos de 0,9 ml, por ejemplo, 0,8 ml, 0,7 ml, 0,6 ml, 0,5 ml, 0,4 ml, 0,3 ml, 0,2 ml, 0,1 ml, 90 µl, 80 µl, 70 µl, 60 µl, 50 µl, 40 µl, 30 µl, 20 µl, 10 µl, 5 µl, 4 µl, 3 µl, 2 µl, 1 µl, o menos, o cualquier cantidad en el medio. Es de entenderse que, a menos que se deje claro específicamente lo contrario, donde el término PCR se usa en este documento, cualquier variante de PCR incluyendo, pero no limitado a PCR en tiempo real y cuantitativo, y cualquier otra forma de amplificación de polinucleótidos se pretende que sea abarcada.

El proceso de detección usado en el ensayo también puede ser multiplexado para permitir múltiples mediciones simultáneas en múltiples reacciones simultáneamente. En algunas realizaciones, estas mediciones se pueden tomar a partir de cámaras de reacción separadas. Algunas de estas realizaciones realizan una pluralidad de reacciones de PCR de forma simultánea en una sola cámara de reacción de PCR, por ejemplo, PCR multiplexado. Un protocolo de PCR puede comprender directrices para llevar a cabo el recocido y desnaturalización sucesivos de los polinucleótidos en la cámara de reacción antes de la detección. Tales directrices, que comprenden un perfil de tiempo para calentar la cámara, se pueden denominar como un "protocolo". Algunas de las realizaciones descritas facilitan el calentamiento y/o enfriamiento consistente a través de una pluralidad de cámaras de reacción que realizan la PCR, al tiempo que facilita la detección utilizando un conjunto de sensores. En ciertas realizaciones, el aparato puede comprender una placa de abertura que facilita el calentamiento y enfriamiento uniformes de las cámaras de reacción mediante la aplicación de presión a un cartucho que contiene una pluralidad de cámaras de reacción de PCR. Ciertos detalles y métodos para el procesamiento de polinucleótidos se pueden encontrar en, por ejemplo, la solicitud de patente US 2009-0131650 y la solicitud de patente US 2010-0009351, incorporada aquí por referencia.

El experto en la materia apreciará que las realizaciones descritas en el presente documento son útiles para varios tipos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, los métodos de amplificación de ácido

nucleico en relación con las realizaciones descritas en este documento pueden incluir, pero no se limitan a: reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), por ejemplo de amplificación del desplazamiento múltiple (MDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), reacción en cadena de la ligasa (LCR), inmuno-amplificación, y una variedad de procedimientos de amplificación basados en la transcripción, incluyendo la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), la replicación de secuencia autosostenida (3SR), y la amplificación por círculo rodante. Véase, por ejemplo, Mullis, "Process for Amplifying, Detecting, and/or Cloning Nucleic Acid Sequences", patente US 4.683.195; Walker, "Strand Displacement Amplification", patente US 5.455.166; Dean et al., "Multiple displacement amplification", patente US 6.977.148; Notomi et al., "Process for Synthesizing Nucleic Acid", patente US 6.410.278; Landegren et al., patente US 4.988.617 "Method of detecting a nucleotide change in nucleic acids"; Birkenmeyer, "Amplification of Target Nucleic Acids Using Gap Filling Ligase Chain Reaction", patente US 5.427.930; Cashman, "Blocked-Polymerase Polynucleotide Immunoassay Method and Kit", patente US 5.849.478; Kacian et al., "Nucleic Acid Sequence Amplification Methods", patente US 5.399.491; Malek et al., "Enhanced Nucleic Acid Amplification Process", patente US 5.130.238; Lizardi et al., *Biotechnology*, 6: 1197 (1988); Lizardi et al., patente US 5.854.033 "Rolling circle replication reporter systems".

En algunas realizaciones descritas en este documento, el ácido nucleico objetivo, por ejemplo, amplicón objetivo, se pueden detectar usando una sonda de oligonucleótidos. Preferiblemente, las sondas incluyen uno o más restos detectables que pueden ser detectados por los sistemas descritos en este documento. El experto en la materia apreciará que varias tecnologías de sonda son útiles en las realizaciones descritas en este documento. A modo de ejemplo, las realizaciones descritas en el presente documento se pueden utilizar con sondas TaqMan®, sondas de baliza moleculares, sondas SCORPION™, y similares.

Los ensayos TaqMan® son ensayos homogéneos para la detección de polinucleótidos (véase la patente US 5.723.591). En los ensayos TaqMan®, dos cebadores de la PCR flanquean un oligonucleótido sonda TaqMan® central. El oligonucleótido sonda contiene un fluoróforo y inhibidor. Durante la etapa de polimerización del proceso de PCR, la actividad nucleasa 5' de las polimerasas escinde el oligonucleótido sonda, haciendo que el resto fluoróforo se convierta en físicamente separado del inhibidor, lo que aumenta la emisión de fluorescencia. Al crearse más producto de la PCR, la intensidad de emisión a los nuevos de longitud de onda se incrementa.

Las balizas moleculares son una alternativa a las sondas TaqMan® para la detección de polinucleótidos, y se describen en, por ejemplo, la patente US 6.277.607; 6.150.097; y 6.037.130. Las balizas moleculares son horquillas de oligonucleótidos que se someten a un cambio conformacional tras la unión a una plantilla perfectamente emparejada. El cambio conformacional del oligonucleótido aumenta la distancia física entre un resto fluoróforo y un resto inhibidor presente en el oligonucleótido. Este aumento de la distancia física hace que el efecto del inhibidor sea disminuido, lo que aumenta la señal derivada del fluoróforo.

El método de sondas adyacentes amplifica la secuencia objetivo mediante la reacción en cadena de la polimerasa en presencia de dos sondas de ácido nucleico que se hibridan a regiones adyacentes de la secuencia objetivo, una de las sondas se marca con un fluoróforo aceptor y la otra sonda marcada con un fluoróforo donante de un par de transferencia de energía de fluorescencia. Tras la hibridación de las dos sondas con la secuencia objetivo, el fluoróforo donante interactúa con el fluoróforo aceptor para generar una señal detectable. La muestra se excita entonces con luz a una longitud de onda absorbida por el fluoróforo donante y la emisión fluorescente desde el par de transferencia de energía de fluorescencia se detecta para la determinación de la cantidad objetivo. La patente US 6.174.670 describe tales métodos.

Los cebadores de salida utilizan una estructura de horquilla similar a las balizas moleculares, pero unidos a una secuencia de unión objetivo, que sirve como un cebador. Cuando se sintetiza la cadena complementaria del cebador, la estructura de horquilla se interrumpe, lo que se elimina la inhibición. Estos cebadores detectan el producto amplificado y no requieren el uso de una polimerasa con una actividad 5' exonucleasa. Los cebadores de salida son descritos por Nazarenko et al. (*Nucleic Acids Res.* 25: 2516-21 (1997) y en la patente US 5.866.336.

Las sondas Scorpion™ combinan una imprimación con una estructura de horquilla añadida, similar a cebadores de salida. Sin embargo, la estructura de horquilla de las sondas SCORPION™ no se abre por síntesis de la cadena complementaria, sino por hibridación de una parte de la estructura de horquilla con una parte del objetivo que está aguas abajo de la porción que se hibrida con el cebador.

DzyNA-PCR implica un cebador que contiene la secuencia antisentido de una ADNzima, un oligonucleótido capaz de escindir enlaces específicos de ARN fosfodiéster. El cebador se une a una secuencia objetivo y las unidades de una reacción de amplificación de la producción de un amplicón que contiene la ADNzima activa. La ADNzima activa, entonces escinde un sustrato indicador genérico en la mezcla de reacción. El sustrato indicador contiene un par fluoróforo-inhibidor, y la escisión del sustrato produce una señal de fluorescencia que aumenta con la amplificación de la secuencia objetivo. DNAzy-PCR se describe en Todd et al., *Clin. Chem.* 46: 625-30 (2000), y en la patente US 6.140.055.

Fiandaca et al. describe un método fluorogénico para el análisis de PCR utilizando una sonda de ácido nucleico peptídico etiquetado con inhibidor (Q-PNA) y un cebador de oligonucleótido marcado con fluoróforo. Fiandaca et al. *Genome Research*. 11: 609-613 (2001). La Q-PNA se hibrida con una secuencia de etiqueta en el extremo 5' del cebador.

Li et al. describe una sonda de doble hebra que tiene un inhibidor y fluoróforo en cadenas de oligonucleótidos opuestas. Li et al. *Nucleic Acids Research*. 30 (2): e5, 1-9 (2002). Cuando no están unidas al objetivo, las hebras se hibridan entre sí y la sonda se inhibe. Sin embargo, cuando un objetivo está presente al menos una hebra se hibrida al objetivo, resultando en una señal fluorescente.

Etiquetas de fluoróforos y restos útiles en las realizaciones dadas a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, colorantes de la familia de la fluoresceína, la familia de la carboxirodamina, la familia de la cianina, y la familia de la rodamina. Otras familias de colorantes que se pueden utilizar en la invención incluyen, por ejemplo, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia lantánido quelados, colorantes de la familia disponible bajo la designación comercial de Alexa Fluor J, de Molecular Probes, y la familia de colorantes disponibles con la designación comercial Bodipy J, de Invitrogen (Carlsbad, Calif.). Los colorantes de la familia de la fluoresceína incluyen, por ejemplo, 6-carboxifluoresceína (FAM), 2', 4', 1,4, -tetraclorofluoresceína (TET), 2', 4', 5', 7', 1,4-hexaclorofluoresceína (HEX), 2', 7'-dimetoxi-4', 5'-dicloro-6-carboxirodamina (JOE), 2'-cloro-5'-fluoro-7-8' fusionado, fenil-1,4-dicloro -6-carboxifluoresceína (NED), 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (VIC), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), y 2', 4', 5', 7'-tetracloro-5-carboxi-fluoresceína (ZOE). Los colorantes de la familia de la carboxirodamina incluyen tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), tetrapropano-6-carboxirodamina (ROX), Texas Red, R110 y R6G. Los colorantes de la familia de la cianina incluyen Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, y Cy7. Los fluoróforos están fácilmente disponibles comercialmente de, por ejemplo, Perkin-Elmer (Foster City, Calif.), Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oreg.), y Amersham GE Healthcare (Piscataway, NJ).

Como se discutió anteriormente, en algunas realizaciones, las sondas útiles en las realizaciones descritas en la presente pueden comprender un inhibidor. Los inhibidores pueden ser inhibidores fluorescentes o inhibidores no fluorescentes. Los inhibidores fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, TAMRA, ROX, DABCYL, DABSYL, colorantes de cianina incluyendo azul nitrotiazol (NTB), antraquinona, verde malaquita, nitrotiazol, y compuestos de nitroimidazol. Ejemplos de inhibidores no fluorescentes que disipan energía absorbida de un fluoróforo incluyen los disponibles bajo la designación comercial Black HoleTM de Biosearch Technologies, Inc. (Novato, Calif.), aquellos disponibles bajo la designación comercial EclipseTM. Dark, de Epoch Biosciences (Bothell, Wash.), aquellos disponibles bajo la designación comercial Qx1J, de Anaspec, Inc. (San Jose, Calif.), y aquellos disponibles bajo la denominación comercial Iowa BlackTM de Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa).

En algunas realizaciones descritas anteriormente, un fluoróforo y un inhibidor se utilizan juntos, y pueden estar en el mismo o en diferentes oligonucleótidos. Cuando se combina juntos, un fluoróforo y el inhibidor de fluorescencia pueden ser referidos como un fluoróforo donante y fluoróforo aceptor, respectivamente. Un número de pares fluoróforo/inhibidor convenientes son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Glazer et al, *Current Opinion in Biotechnology*, 1997; 8:94-102; Tyagi et al, 1998, *Nat Biotechnol*, 16:49 a 53) y están fácilmente disponibles comercialmente de, por ejemplo, Molecular Probes (Junction City, Oreg.), y Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Ejemplos de fluoróforos donantes que pueden ser utilizados con diferentes fluoróforos aceptores incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, Lucifer Yellow, B-ficoeritrina, 9-acridineisotiocianato, Lucifer Yellow VS, 4-acetamido-4'-isotio-cianatostilbeno-2, 2'-ácido disulfónico, 7-dietilamino-3- (4'-isotiocianatofenil) -4-metil-cumarina, succinimidil 1-pirenobutirato, y 4-acetamido-4' isotiocianatostilbeno-2, derivados de ácido 2'-disulfónico. Los fluoróforos aceptores típicamente dependen del fluoróforo donante utilizado. Ejemplos de fluoróforos aceptores incluyen, pero no se limitan a, LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, Cy5.5, Lisamina rodamina B sulfonil cloruro, tetrametil rodamina isotiocianato, rodamina x isotiocianato, eritrosina isotiocianato, fluoresceína, pentaacetato de dietilentriamina u otros quelatos de iones lantánidos (por ejemplo, Europio, o Terbio). Los fluoróforos donante y aceptor están fácilmente disponibles comercialmente de, por ejemplo, Molecular Probes o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Los pares fluoróforo/inhibidor útiles en las composiciones y métodos descritos en este documento son bien conocidos en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, descritos en S. Marras, "Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes" disponibles en el sitio www.molecular-beacons.org/download/marras,mmb06%28335%293.pdf (al 11 de abril de 2012).

El proceso de detección usado en los ensayos descritos en el presente documento ventajosamente permite múltiples mediciones simultáneas de múltiples restos detectables, por ejemplo, una pluralidad de sondas que contienen diferentes restos detectables, etc. En algunas realizaciones, estas mediciones se pueden tomar de cámaras de reacción separadas dentro de un cartucho de microfluidos, por ejemplo, que comprende una capa de cámara (la capa de cámara a la que se hace referencia en el presente documento a la porción del cartucho de microfluidos que contiene las cámaras de reacción). Algunas de estas realizaciones realizan una pluralidad de reacciones de amplificación simultáneamente en una sola cámara de reacción, por ejemplo, PCR multiplex. Un protocolo de PCR puede comprender directrices para llevar a cabo el recocido y desnaturalización sucesivos de los polinucleótidos en la cámara de reacción antes de la detección. En ciertas realizaciones, el aparato está configurado para facilitar el

calentamiento y/o de enfriamiento uniforme a través de una pluralidad de cámaras de reacción para llevar a cabo la amplificación de ácido nucleico, y para facilitar la detección de los amplicones objetivo en cámaras de reacción individuales, por ejemplo, mediante la detección de emisiones fluorescentes a partir de una matriz de sensor.

- 5 En ciertas realizaciones, el aparato puede comprender una placa de abertura que facilita el calentamiento y enfriamiento uniforme de las cámaras de reacción mediante la aplicación de presión a un cartucho que contiene una pluralidad de cámaras de reacción a través de varios pares ópticos, independientes. La placa de abertura está configurada preferentemente para permitir y facilitar la generación y detección de señales de fluorescencia de las sondas dentro de múltiples cámaras de reacción independientes. En algunas realizaciones, la placa de abertura está configurada de tal manera que hay una abertura individual (o ventanas), colocada sobre cada una de las cámaras de reacción individuales en el cartucho de microfluidos.

Aparato de diagnóstico

- 15 Las figuras 1A y 1B muestran un aparato de diagnóstico 10 de algunas de las presentes realizaciones. En la realización ilustrada en la figura 1A, el aparato de diagnóstico incluye una carcasa del aparato 30. La carcasa 30 puede garantizar un entorno controlado para el procesamiento de las muestras de microfluidos y para impedir que la luz no deseada entre en el espacio de detección. La carcasa 30 puede comprender una cubierta 16 que incluye un mango 14 y una ventana translúcida 12. La cubierta 16 puede ser llevada hacia abajo para cerrar la abertura en la parte frontal del aparato de diagnóstico 10 cuando el aparato de diagnóstico 10 está en funcionamiento.

- 20 Como se ve en las realizaciones de las figuras 1A y 1B, el aparato de diagnóstico 10 puede alojar dos bastidores de especímenes 24a, 24b en la parte frontal del aparato de diagnóstico 10. El experto en la técnica apreciará, sin embargo, que la representación del aparato de diagnóstico en las figuras 1A y 1B es únicamente ejemplar, y que, en algunas realizaciones, el aparato se puede configurar para alojar bastidores de más de dos especímenes, por ejemplo, bastidores de tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más especímenes. Preferiblemente, el aparato está configurado para alojar el mismo número de bastidores de especímenes, por ejemplo, dos, como cartuchos de microfluidos.

- 30 En algunas realizaciones, cada bastidor de espécimen 24a, 24b puede incluir múltiples soportes 26. Los soportes 26 pueden incluir recipientes para contener reactivos de diagnóstico, tales como reactivos para la amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, reactivos de la PCR o similares. Los bastidores 24 pueden también incluir tubos de especímenes (no se muestra) y tubos de mezcla (no mostrados) para la preparación de muestras listas para el diagnóstico, tales como muestras listas para la amplificación. El aparato puede preparar los reactivos deseados en los bastidores 24a, 24b usando el dispensador 400. Una descripción adicional de diversos dispensadores de fluido se puede encontrar en, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente US 20090130719 y la publicación de la solicitud de patente US 20090155123, incorporadas aquí por referencia.

- 40 En algunas realizaciones, las cámaras de reacción dentro del cartucho(s) de microfluidos incluye uno o más reactivos, tampones, etc., usados en el ensayo de amplificación nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las cámaras de reacción del cartucho de microfluidos pueden incluir, por ejemplo, cebadores de amplificación, sondas, nucleótidos, enzimas tales como la polimerasa, agentes tampón, o similares. A modo de ejemplo, en algunas realizaciones, las cámaras de reacción pueden incluir reactivos liofilizados, a los que se añade la muestra biológica procesada (por ejemplo, una solución de ácidos nucleicos extraídos). Los fluidos preparados pueden entonces ser transferidos a un cartucho de microfluidos y ser insertados en módulos calentadores/ópticos 500a, 500b para el procesamiento y análisis.

- 50 La figura 1A es una vista en planta frontal del aparato de diagnóstico 10 de algunas de las realizaciones. Como se ve en la figura 1A, el aparato de diagnóstico 10 puede incluir un dispensador de fluido 400, montado en un carril lateral 20. El carril lateral 20 puede ser parte de un pórtico accionado por motor 18, que también puede incluir un carril de proa-popa 22 (no mostrado). El carril de proa-popa 22 puede estar conectado al carril lateral 20 y se monta perpendicularmente al carril lateral 20 en el aparato de diagnóstico 10.

- 55 La figura 1A ilustra además la cubierta 28 sobre los módulos calentadores/ópticos 500a, 500b. Las bandejas de recepción 520a y 520b pueden estar situadas por debajo o dentro de la carcasa de los módulos calentadores/ópticos 500a, 500b. La bandeja de recepción 520a se ilustra en una posición abierta, haciendo que esté disponible para recibir un cartucho de microfluidos 200. La bandeja de recepción 520b se ilustra en una posición cerrada. Al cerrar la bandeja no solo coloca a los reactivos en la posición adecuada para el procesamiento, sino que también protege aún más el interior de los módulos calentadores/ópticos de recibir cualquier luz no deseada. Cuando luz parásita se introduce en la zona de detección, el sistema puede identificar niveles fluorescentes erróneos derivados de luz que no se emita desde la cámara de reacción.

- 65 La figura 1B es una vista en perspectiva del aparato de diagnóstico 10 que muestra algunos de los componentes internos que se encuentran en algunas de las realizaciones. Para ilustrar mejor ciertas características, la carcasa del aparato 30, la cubierta 16, y la cubierta de los calentadores/ópticos 28 que se encuentra en la figura 1A se han quitado de la vista en la figura 1B. Se muestra en la figura 1B el pórtico 18, incluyendo el carril 20 del carril proa-

popa lateral 22. El dispensador de fluido 400 puede estar montado en el carril lateral 20 y puede deslizarse lateralmente a lo largo del carril lateral largo 20. El carril lateral 20 puede estar conectado al carril de proa-popa 22 que puede moverse en la dirección antero-posterior. De esta manera el dispensador de fluido 400 está disponible para moverse en la dirección X, Y a lo largo del dispositivo de diagnóstico 10. Como se describe más adelante, el dispensador de fluido 400 puede también ser capaz de moverse arriba y abajo en el plano z en el carril lateral 20, dando así al dispensador 400 la capacidad de moverse en tres grados de dirección a lo largo del dispositivo de diagnóstico 10.

También se muestra en la figura 1B los módulos calentadores/ópticos 500a, 500b con la cubierta 28 de los módulos calentadores/ópticos de la figura 1A eliminada. Las bandejas de recepción 520a y 520b se representan en la posición abierta y están sosteniendo cada una los cartuchos 200. En algunas realizaciones, las bandejas de recepción pueden incluir cada una un sustrato calentador 600 (no mostrado) por debajo de cada uno de los cartuchos de microfluidos 200. Los módulos calentadores/ópticos 500a, 500b puede también incluir cada uno un cabezal de detección 700 que se describe con mayor detalle a continuación.

Como se describirá en más detalle a continuación, el aparato de diagnóstico 10 puede ser capaz de llevar a cabo diagnósticos en tiempo real en una o más muestras. La muestra a probar puede primero ser colocada en un tubo de muestra (no se muestra) en el bastidor 24a o 24b. Los reactivos de diagnóstico pueden estar situados en los soportes 26 en el bastidor 24a en el interior del aparato de diagnóstico 10. El dispensador de fluido 400 puede mezclar y preparar la muestra para las pruebas de diagnóstico y luego puede entregar la muestra preparada en el cartucho de microfluidos 200 para ciclos térmicos y de detección de analito en los módulos calentadores/ópticos 500a, 500b. Alternativamente, el dispensador de fluido 400 puede entregar muestras de ácido nucleico a las cámaras de reacción del cartucho de microfluidos, en el que las cámaras de reacción del cartucho de microfluidos ya contienen reactivos para una reacción de amplificación.

La figura 2 ilustra una vista del interior del aparato de diagnóstico 10, que muestra el bastidor 24a soportando una serie de tubos de muestra 32 y soportes de reactivos 26, y un cartucho 200 situado en la bandeja de recepción 520a. La bandeja de recepción 520a está en una posición abierta que se extiende desde el módulo de calentador/óptica 500a que tiene la tapa 28 adjunta. La bandeja de recepción 520b está en una posición cerrada. Ventajosamente, en algunas realizaciones, las bandejas de recepción 520a, b pueden permitir la fácil colocación del cartucho de microfluidos 200, por un usuario o por un dispositivo de carga automática. Tal diseño también puede acomodar un pipeteo multiplexado de las muestras utilizando el dispensador de fluido robótico 400.

Bandeja de recepción

Como se ilustra en la figura 2, la cavidad rebajada 524 puede ser una porción de la bandeja de recepción 520 que está configurada para recibir selectivamente el cartucho de microfluidos 200. Por ejemplo, la cavidad rebajada 524 y el cartucho de microfluidos 200 pueden tener un borde 526 que es complementario en forma, de manera que el cartucho de microfluidos 200 se recibe selectivamente en, por ejemplo, una sola orientación. Por ejemplo, el cartucho de microfluidos 200 puede tener un elemento de registro 202 que encaja en una característica complementaria de la cavidad. El miembro de registro 202 puede ser, por ejemplo, un corte en un borde del cartucho 200 (como se muestra en la figura 3A) o una o más muescas que se hacen en uno o más de los lados. El experto en la materia apreciará fácilmente que la complementariedad entre el cartucho y la cavidad receptora se puede lograr fácilmente utilizando otras disposiciones adecuadas, por ejemplo, un poste o protuberancia que encaja dentro de una abertura. Al recibir selectivamente el cartucho 200, la cavidad rebajada 524 puede ayudar a un usuario a colocar el cartucho 200 de modo que el módulo óptico 502 puede funcionar correctamente en el cartucho 200. De esta manera, se puede lograr la alineación libre de errores de los cartuchos 200.

La bandeja de recepción 520 puede estar alineada de manera que los diversos componentes del aparato que pueden operar en el cartucho de microfluidos 200 (tal como, fuentes de calor, detectores, los elementos de fuerza, y similares) están en condiciones de funcionar correctamente en el cartucho de microfluidos 200 mientras que el cartucho 200 se recibe en la cavidad rebajada 524 de la bandeja de recepción 520. Por ejemplo, fuentes de calor de contacto sobre el sustrato calentador 600 pueden estar situadas en la cavidad rebajada 524 de manera que las fuentes de calor pueden ser acopladas térmicamente a lugares distintos en el cartucho de microfluidos 200 que se recibe en la bandeja de recepción 520.

Cartucho de microfluidos

Ciertas realizaciones contemplan un cartucho de microfluidos configurado para llevar a cabo la amplificación, tal como mediante PCR, de uno o más polinucleótidos de una o más muestras. Por cartucho se quiere decir una unidad que puede ser desechable o reutilizable en su totalidad o en parte, y que puede estar configurada para ser usada en conjunción con algún otro aparato que ha sido adecuadamente y complementariamente configurado para recibir y operar en (tal como entregando energía a) el cartucho.

Por microfluidos, tal como se usa en el presente documento, se entiende que los volúmenes de muestra y/o reactivo, y/o polinucleótido amplificado son de aproximadamente 0,1 μ l a aproximadamente 999 μ l, tal como desde 1 hasta

100 µl, o 2-25 µl, como se define anteriormente. Del mismo modo, tal como se aplica a un cartucho, el término microfluídico significa que diversos componentes y canales del cartucho, como se describe adicionalmente en el presente documento, se configuran para aceptar, y/o retener y/o facilitar el paso de los volúmenes de microfluidos de la muestra, reactivo, o polinucleótido amplificado. Ciertas realizaciones en el presente documento también pueden funcionar con volúmenes de nanolitros (en el rango de 10-500 nanolitros, tales como 100 nanolitros).

La figura 3A es una vista en planta superior de un cartucho de microfluidos 200. El cartucho 200 puede comprender una pluralidad de vías de muestra 1706a-c. Las vías pueden llevar a las cámaras de PCR 1703 situadas en los lados "izquierdo" y "derecho" (es decir, las filas) del cartucho. Como se indica en la figura 3a, las vías pueden proporcionar orificios de entrada 1705 en una ubicación conveniente cerca del usuario. Sin embargo, las vías a las que los puertos están conectados a continuación, pueden tomar caminos independientes para separar las cámaras 1703a-c. En la realización de la figura 3a, por ejemplo, la primera vía 1706a está en comunicación con la primera cámara 1703a del lado izquierdo, la segunda vía 1706b está en comunicación con la primera cámara 1703b del lado derecho, la tercera vía 1706c está en la comunicación con la segunda cámara 1703c del lado izquierdo, etc. Cada una de las vías de microfluidos puede comprender también válvulas de microfluidos 1702, 1704, puertas de microfluidos, y canales de microfluidos. Estas puertas y las válvulas pueden estar configuradas, por ejemplo, mediante el accionamiento térmico, para facilitar la liberación temporizada y la difusión controlada de ciertos fluidos dentro de las vías 1706 del cartucho 200. El cartucho de esta realización puede comprender orificios de ventilación 1701 que impiden que el aire bloquee el paso de fluido dentro del cartucho. Una descripción más detallada de los diversos componentes del cartucho, tales como válvulas, se puede encontrar en, por ejemplo, la Solicitud de Patente U.S. Publicación 2009-0130719, incorporada aquí por referencia.

El cartucho de microfluidos 200 puede incluir un elemento de registro 202, por ejemplo, un recorte, lo que corresponde a un borde complementario en la cavidad rebajada 524 de la bandeja de recepción 520a, b de los módulos calentadores/ópticos 500a, 500b. El elemento de registro 202 y el borde complementario 526 pueden permitir la colocación segura y correcta del cartucho de microfluidos 200 en la bandeja de recepción 520a, b.

En diversas realizaciones, los componentes de una red de microfluidos en los carriles de muestra 1706 del cartucho 200 se puede calentar mediante el acoplamiento térmico con los calentadores en un sustrato calentador 600. El sustrato calentador 600 puede estar configurado para calentar una mezcla de muestra, que comprende reactivos de amplificación y una muestra de polinucleótido lista para la amplificación y hacer que se sometan a condiciones de ciclos térmicos adecuadas para la creación de los amplicones de la muestra lista para la amplificación. El sustrato calentador 600 puede estar situado en el cartucho 200 en algunas realizaciones o en la cavidad rebajada 524.

La red de microfluidos en cada vía puede estar configurada para llevar a cabo la amplificación de ácido nucleico, tal como por PCR, en una muestra lista para amplificación, tal como una que contiene ácido nucleico extraído de una muestra. Una muestra lista para la amplificación puede comprender una mezcla de reactivos de amplificación y la muestra de polinucleótido extraída. La mezcla puede ser adecuada para someter a las condiciones de ciclado térmico para crear amplicones de la muestra de polinucleótido extraída. Por ejemplo, una muestra lista para la amplificación, tal como una muestra lista para PCR, puede incluir una mezcla de reactivos de PCR que comprende una enzima polimerasa, un ácido nucleico de control positivo, una sonda de hibridación fluorogénica selectiva para al menos una parte del ácido nucleico de control positivo y una pluralidad de nucleótidos, y al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótido objetivo. La red de microfluidos puede estar configurada para calentarse por acoplamiento desde una fuente externa de calor con la mezcla que comprende el reactivo de PCR y la muestra de polinucleótido extraída en condiciones de ciclos térmicos adecuados para la creación de amplicones de PCR de la muestra de polinucleótido extraída.

En diversas realizaciones, la mezcla de reactivos puede comprender etiquetas fluorescentes u otras ópticamente detectables para la detección de la generación de un amplicón deseado. En algunas realizaciones, varios conjuntos de cebadores y varias etiquetas se pueden utilizar en un formato multiplex ensayo, por ejemplo, PCR multiplexada, donde cada uno de una pluralidad de diferentes amplicones pueden detectarse en una única cámara de reacción, si está presente. Por ejemplo, una cámara de ensayo podría incluir ácidos nucleicos de plantilla de una muestra de ensayo, ácidos nucleicos de plantilla de control positivo, uno o más pares de cebadores para la amplificación de secuencias objetivo específicas, una o más sondas para la detección de amplicones objetivo y uno o más pares de cebadores y una sonda para la detección de amplicones de control positivo. Adicionalmente, el experto en la técnica apreciará que, en algunas realizaciones, el cartucho de microfluidos acomoda un polinucleótido de control negativo que no producirá un amplicón con pares de cebadores utilizados para amplificar las secuencias objetivo o de control positivo.

En algunas de las realizaciones ilustradas, las cámaras 1703a-c respectivamente asociadas con cada vía 1706a-c de un cartucho de múltiples vías 200 pueden llevar a cabo reacciones de amplificación independientes. Los resultados de las reacciones de la primera columna de cámaras (1703a, 1703b) para las dos primeras vías (1706a, 1706b) pueden entonces ser medidas simultáneamente y de forma independiente utilizando un cabezal de detección que comprende un par fotodetector de fuente de luz "derecho" y uno "izquierdo". Es decir, cada cámara 1703a-b de cada vía 1706a-b puede recibir luz procedente de una fuente de luz independiente y ser observada por un fotodetector secundario al mismo tiempo. De esta manera, una variedad de combinaciones de reacciones puede

llevarse a cabo en el cartucho de manera eficiente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una pluralidad de ensayos de amplificación para la detección de una pluralidad de ácidos nucleicos objetivo se pueden realizar en una vía, un control positivo y un control negativo en otras dos vías; o uno o más ensayos de amplificación para la detección de uno o más ácidos nucleicos objetivo, respectivamente, en combinación con un control positivo interno en una vía, con un control negativo en una vía separada. En una realización particular, 2, 3, 4, 5, 6, o más ensayos son multiplexados en un solo carril, con al menos ese número de fluoróforos de distinta fluorescencia en la cámara de reacción.

Un cartucho de microfluidos 200 puede construirse a partir de un número de capas. Por consiguiente, un aspecto de la presente tecnología se refiere a un cartucho de micro fluido que comprende una primera, segunda, tercera, cuarta, y quinta capas en el que una o más capas definen una pluralidad de redes de microfluidos, cada red teniendo diversos componentes configurados para llevar a cabo la PCR en una muestra en la que se determinará la presencia o ausencia de uno o más polinucleótidos. En otra realización, el cartucho de microfluidos 200 puede comprender una pluralidad de vías, cada una incluyendo una cámara de reacción, grabada o moldeada en un solo plano, tal como en un sustrato de plástico moldeado, con cada vía siendo cerrada por una capa de cubierta, tal como una capa de película de plástico adhesiva. Se contemplan realizaciones con 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30, o más vías por cartucho. Por ejemplo, un diseño adecuado es un solo cartucho 200 que tiene 24 cámaras de reacción, dispuestas en dos filas de cámaras de reacción 12, que opcionalmente tiene orificios de entrada relativamente alineados. Una descripción más detallada de los diversos cartuchos y sus componentes se pueden encontrar en, por ejemplo, la publicación de la Solicitud de Patente U.S. 2008-0182301 y la publicación de Solicitud de Patente U.S. 2009-0130719, incorporada aquí por referencia.

Sustrato calentador

Se muestra en la figura 3B una vista en planta superior de ciertas realizaciones del sustrato calentador 600. Cualquier tipo de calentador se puede utilizar, incluyendo resistivo, Peltier, o calentadores de movimiento de fluido, ya sea con enfriamiento pasivo o activo contemplado. Una de las muchas posibles realizaciones incluye una pluralidad de calentadores resistivos en contacto térmico con cada cámara de reacción, preferiblemente también incluye uno o más sensores de temperatura. Debido a que los calentadores resistivos también exhiben algún efecto termistor, es decir, su resistencia cambia con la temperatura, los calentadores resistivos en sí mismos pueden funcionar como sensores de temperatura, permitiendo el control preciso de la temperatura de cada cámara de reacción al tiempo que simplifica el diseño del producto. Aunque los calentadores pueden ser controlados en concierto con otros, en algunas realizaciones cada cámara de reacción puede tener uno o más calentadores individuales en contacto térmico con la misma, de tal manera que los calentadores son controlables por separado y cada cámara de reacción se puede calentar y se deja enfriar de forma independiente de las otras cámaras de reacción. Esto permite que diferentes ensayos se realicen simultáneamente en cada uno de una pluralidad de cámaras de reacción. Un conjunto de calentador resistivo particular para su uso con una cámara de reacción individual se muestra en la figura 3B. En la realización mostrada en la figura 3B, cualquier combinación de un calentador de sensor/sensor superior 1604, un calentador/sensor inferior 1603, un calentador/sensor lateral 1601 y un calentador/sensor central 1602 pueden ser utilizados para calentar la cámara de reacción que se encuentra por encima. Para facilidad de comprensión, un esquema de la cámara de PCR 1703 de algunas de las realizaciones se superpone sobre el sustrato calentador. En ciertas realizaciones, los calentadores en el sustrato calentador 600 pueden ser calentadores de contacto. Tales calentadores de contacto pueden comprender (por ejemplo) un calentador resistivo (o de la red de la misma), un radiador, un intercambiador de calor de fluido y un dispositivo Peltier. La fuente de calor de contacto puede ser configurada en la cavidad rebajada 524 para ser acoplada térmicamente a una o más ubicaciones distintas del cartucho de microfluidos 200 recibida en la bandeja de recepción 520a, b por lo que las distintas localizaciones se calientan selectivamente. Las fuentes de calor de contacto pueden cada una ser configuradas en el sustrato calentador 600 para ser independientemente acopladas térmicamente a una ubicación distinta diferente en un cartucho de microfluidos 200 recibido en la bandeja de recepción 520a, b por lo que las distintas localizaciones se calientan de forma independiente. Las fuentes de calor de contacto, ventajosamente, pueden ser configuradas para estar en contacto físico directo con ubicaciones distintas de un cartucho de microfluidos 200 recibido en la bandeja de recepción 520a, b. En varias realizaciones, cada calentador fuente de contacto puede estar configurado para calentar una ubicación distinta con un diámetro medio en 2 dimensiones de aproximadamente 1 milímetro (mm) a aproximadamente 15 mm (típicamente de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm), o en un lugar distinto que tiene un área superficial de entre aproximadamente 1 mm sobre 225 mm (en algunas realizaciones entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 100 mm, o en algunas realizaciones entre aproximadamente 5 mm y aproximadamente 50 mm).

El calentador de sustrato 600 puede ser organizado en "vías" 1605a, b paralela a la estructura de las vías 1706a-c del cartucho 200. En algunas realizaciones, el sustrato calentador 600 puede incluir 24 vías de calentador 1605a, 1605b correspondientes a las vías de la muestra 1706 del cartucho 200. Cuando el cartucho de microfluidos 200 se coloca en la cavidad rebajada 524 de la bandeja de recepción 520a, b, los componentes del cartucho 200 pueden estar alineados adyacentes a, y por encima de, los calentadores correspondientes en el sustrato calentador 600. Cuando el cartucho de microfluidos 200 se coloca en la cavidad rebajada 524, los calentadores pueden estar en contacto físico con los componentes respectivos. En algunas realizaciones los calentadores permanecen acoplados térmicamente a sus respectivos componentes, por ejemplo, a través de una o más capas o materiales intermedios,

aunque no en contacto físico directo. Una descripción adicional de las vías se puede encontrar, por ejemplo, en la de la solicitud de patente US 20090130719, incorporada en el presente documento por referencia.

En algunas realizaciones, múltiples calentadores pueden estar configurados para activarse simultáneamente y uniformemente para calentar sus respectivos componentes del cartucho adyacentes de la red de microfluidos en el cartucho de microfluidos 200. Cada calentador puede ser controlada independientemente por un circuito de procesador y/o de control utilizado en conjunción con el aparato descrito en el presente documento. Generalmente, el calentamiento de los componentes microfluidos (puertas, válvulas, cámaras, etc.) en el cartucho de microfluidos 200, se controla haciendo pasar corrientes a través de los calentadores de microfabricados adecuadamente configurados. Bajo el control de la circuitería adecuada, las vías 1706 de un cartucho de varias vías a continuación se pueden calentar de forma independiente, y de ese modo controlar de forma independiente, la una de la otra. Además, como se describe con más detalle a continuación, los calentadores individuales 1601-1604 se pueden calentar de forma independiente, y de ese modo controlarse de forma independiente, el uno del otro. Esto puede conducir a una mayor eficiencia y control del aparato de energía, porque no todos los calentadores están calentando al mismo tiempo, y un calentador dado está recibiendo corriente solamente durante la fracción del tiempo que se requiere para calentarse.

El sustrato calentador 600 puede incluir también uno o más sensores de calor. Con el fin de reducir el número de sensores o calentadores necesarios para controlar los calentadores en las vías de calentador 1605a, 1605b, los calentadores pueden ser utilizados para detectar la temperatura, así como el calor, y de ese modo evitar la necesidad de tener un sensor dedicado separado para cada calentador. Por ejemplo, la impedancia y/o la resistencia de algunos materiales cambian con la temperatura ambiente. De acuerdo con ello, la resistencia del calentador/sensores 1601-1604 se puede usar como una indicación de la temperatura cuando los sensores no están siendo calentados activamente.

En algunas realizaciones, los calentadores en el sustrato calentador 600 pueden ser diseñados para tener suficiente potencia para permitir que los calentadores sean agrupados en serie o en paralelo para reducir el número de elementos electrónicamente controlables, lo que reduce la carga sobre los circuitos electrónicos asociados. Los calentadores que se agrupan de esta manera serían operados bajo control sincronizado y sustancialmente simultáneo.

En algunas realizaciones, los calentadores de cámara de reacción en los lados opuestos de los calentadores de segunda etapa se pueden agrupar y configurar para operar bajo el control sincronizado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los calentadores de PCR/amplificación 1601-1602 se pueden agrupar y configurar para operar bajo el control sincronizado. Agrupaciones y configuraciones alternativas se pueden aplicar a otros grupos de calentador de los calentadores de PCR/amplificación 1601-1604. Los calentadores de PCR/amplificación 1601-1604 pueden estar configurados para funcionar de forma individual y de forma independiente o pueden ser configurados para operar en grupos de dos (pares), tres (tríos), cuatro, cinco o seis.

En algunas realizaciones, el calentamiento puede ser controlado encendiendo y apagando periódicamente la corriente para un calentador respectivo con diferente modulación de ancho de pulso (PWM), en el que la modulación de ancho de pulso se refiere a la relación del tiempo de funcionamiento/apagado para la corriente. La corriente puede suministrarse mediante la conexión de un calentador micro fabricado a una fuente de alta tensión (por ejemplo, 30 V), que puede ser cerrada por la señal de PWM. En algunas realizaciones, el dispositivo puede incluir 48 generadores de señales de PWM. En algunas realizaciones, habrá dos generadores de señales de PWM asociados con cada cámara de reacción. El funcionamiento de un generador de PWM puede incluir la generación de una señal con un período elegido, programable (el recuento final) y la granularidad. Por ejemplo, la señal puede ser 4000 μ s (microsegundo) con una granularidad de 1 μ s, en cuyo caso el generador de PWM puede mantener un contador que comienza en cero y avanza en incrementos de 1 μ s hasta que llega a 4000 μ s, cuando vuelve a cero. Por lo tanto, la cantidad de calor producida se puede ajustar mediante el ajuste del recuento final. Un recuento final alto corresponde a una mayor cantidad de tiempo durante el cual el micro fabricado calentador con corriente y, por tanto, una mayor cantidad de calor producido.

En diversas realizaciones, el funcionamiento de un generador de PWM puede incluir también un recuento de inicio programable además de la cuenta final antes mencionada y granularidad. En tales realizaciones, múltiples generadores de PWM pueden producir señales que pueden ser selectivamente no superpuestas (por ejemplo, mediante la multiplexación del tiempo de encendido de los diversos calentadores) de tal manera que no se exceda la capacidad de corriente de la fuente de alta tensión.

Los calentadores múltiples pueden ser controlados por diferentes generadores de señal PWM con diferentes recuentos de inicio y final. Los calentadores se pueden dividir en bancos, por el que un banco define un grupo de calentadores del mismo recuento de inicio. El control de elementos de calefacción y de elementos de refrigeración, si está presente, en ciertas realizaciones se discute en más detalle a continuación.

Módulo óptico

Las figuras 4A-C ilustran el módulo calentador/óptico 500 del aparato de detección 10 se encuentra en ciertas realizaciones. El módulo calentador/óptico 500 puede comprender un módulo óptico 502 y una bandeja de recepción 520 o una porción de la bandeja de recepción. La figura 4A muestra una realización del módulo óptico cerrado 502 que tiene un motor 504 conectado externamente al mismo para conducir el movimiento del cabezal de detección 700. El cabezal de detección 700 puede estar alojado en el interior del módulo óptico 502. La figura 4A ilustra la bandeja de recepción 520 acoplada a un lado inferior 506 del módulo óptico 502. La bandeja de recepción 520 puede recibir un cartucho 200 que comprende muestras en las que se va a realizar la detección. Después de recibir las muestras, la bandeja de recepción 520 se puede mover (por ejemplo, mecánica o manualmente) en los carriles 522 a una posición por debajo del módulo óptico 502. En algunas realizaciones, descritas en mayor detalle a continuación, la bandeja de recepción puede comprender un dispositivo de auto-carga, que alinea automáticamente el cartucho una vez posicionado debajo del módulo óptico 502. En algunas realizaciones, una cavidad rebajada 524 de la bandeja de recepción 520 puede contener un sustrato calentador 600. En algunas realizaciones, la bandeja de recepción, posteriormente, se puede elevar para colocar el cartucho en contacto con el módulo óptico 502, tal como en contacto con una placa de abertura 540 en la base del módulo óptico 502

La figura 4B ilustra una realización del módulo óptico 502 con un panel frontal 508 retirado para mostrar el interior del módulo óptico 502. Se muestra en la figura 4B es el cabezal de detección 700. Como se describe en detalle a continuación, el movimiento del cabezal de detección 700 puede ser accionado por el motor 504 para moverse lateralmente a través del interior del módulo óptico 502 para proporcionar la exploración óptica y la detección en el cartucho 200 cuando el cartucho 200 está colocado por debajo del módulo óptico 502 en la bandeja de recepción 520. Se muestra en la figura 4B es una placa de abertura 540, situada en el lado inferior 506 del módulo óptico 502.

La figura 4C proporciona una vista en planta inferior del módulo óptico 502. Se muestra en la figura 4C es la placa de abertura 540 y una placa normalizadora 546 unido a la parte inferior del 506 del módulo óptico 502. La placa normalizadora puede ser utilizada para calibrar los pares de fuente de luz - fotodetector del cabezal de detección. La placa normalizadora 546 comprende preferiblemente uno o más componentes que tienen características ópticas estandarizados, conocidas y que están configurados para calibrar, normalizar, o confirmar el funcionamiento adecuado del cabezal de detección 700 y la circuitería asociada. La placa normalizadora 546 puede extenderse en el módulo óptico y el detector 700 puede ser colocado sobre la placa normalizadora. En algunas realizaciones, antes del inicio de las mediciones ópticas de los cartuchos del cabezal de detección 700 se calibra con las propiedades conocidas de la placa normalizadora 546. Si el cabezal de detección 700 no está funcionando adecuadamente, la acción correctiva puede ser tomada, como la inclusión de un desplazamiento en las mediciones o notificar al usuario del error. En algunas realizaciones, la placa normalizadora puede ser de un material ópticamente transparente, tal como policarbonato mezclado con un colorante altamente fluorescente u otro cromóforo o fluoróforo estandarizado. En una realización, la placa normalizadora incluye un cromóforo o fluoróforo normalizado para cada canal o de color en el cabezal del detector 700.

Como se muestra en la figura 4C, la placa de abertura 540 contiene aberturas 557. Las dimensiones de las aberturas 557 son tales que las fuentes de luz y fotodetectores del detector pueden tener acceso a (ópticamente excitar o ver) el contenido en las cámaras de reacción de los cartuchos 200 cuando el detector se mueve a una pluralidad de posiciones dentro del módulo óptico 502. Es decir, cuando un par de fuente de luz-fotodetector del detector se encuentra en una posición de abertura sobre una luz particular puede viajar desde la fuente de luz y llegar a la cámara del reactor a través de la abertura 557. Los reactivos fluorescentes en la cámara de reacción pueden entonces ser visibles para el fotodetector a través de la abertura 557.

Cabezal detector

La figura 5 muestra una sección transversal del cabezal de detector 700 tomada a lo largo de la línea 13 de la figura 4B. El cabezal de detector 700 puede estar configurado para excitar ópticamente y/o monitorizar la fluorescencia emitida en relación con la detección de uno o más polinucleótidos presentes en las cámaras de reacción 1703. Debe tenerse en cuenta que un resultado positivo (presencia de un amplicones objetivo) puede estar indicado por un aumento de la fluorescencia o una disminución de la fluorescencia, dependiendo del diseño del ensayo. Por ejemplo, cuando el ensayo implica un fluoróforo y un inhibidor, el inhibidor puede inhibir la fluorescencia cuando el objetivo está presente, o en otros diseños de ensayo, cuando el objetivo está ausente. El sistema puede comprender, por ejemplo, una pluralidad de pares de detectores, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o más, tal como el par detector 726. Cada par detector 726 puede comprender una fuente de luz 726a, tal como un diodo emisor de luz (LED), y un correspondiente detector de luz 726b, tal como un fotodiodo. La fuente de luz 726a puede emitir selectivamente luz en una banda de absorción de una sonda fluorescente. El detector de luz 726b puede detectar selectivamente luz en una banda de emisión de la sonda fluorescente, en el que la sonda fluorescente corresponde a una sonda de polinucleótido o a un fragmento de la misma. En ciertas realizaciones, la fuente de luz 726a puede comprender un diodo de paso de banda filtrado que emite selectivamente luz en la banda de absorción de la sonda fluorescente. El detector de luz 726b puede comprender un fotodiodo de paso de banda filtrado que detecta selectivamente la luz en la banda de emisión de un resto fluorescente, por ejemplo, emisión desde una sonda fluorescente. En ciertas realizaciones, un filtro 726a1, tal como un filtro de paso

de banda, se puede aplicar a la luz de la fuente de luz 726a. La luz de la fuente de luz 726a pasa a través de un filtro antes de pasar a través de la muestra en el canal de microfluído (profundidad 300g en ciertas realizaciones). En ciertas realizaciones, la longitud de la trayectoria óptica para la luz desde la cámara de reacción al detector de luz 726b puede ser muy pequeña. La luz incidente desde la fuente de luz 726a genera fluorescencia en la cámara de reacción. La luz desde la cámara de reacción se desplaza entonces hacia el detector de luz 726b. Ciertas realizaciones tratan de mitigar que cualquier luz no deseada entre en el detector, lo que perjudica la señal de luz desde la cámara de reacción.

En algunas realizaciones, cada uno de la pluralidad de pares detectores pueden estar dispuestos a lo largo de la longitud del cabezal de detector 700 en filas. Es decir, detrás de los pares 726 y 727 ilustrados en la figura 5 puede haber otra columna de pares en una orientación similar o igual. Por el bien de la explicación, una colección de cartuchos o pares de detectores a lo largo de la longitud del cartucho se conoce como un "fila" y los que están a lo largo de la anchura como una "columna". Por lo tanto, la dirección vertical en las figuras 3A y 6 indica una "columna" y la dirección horizontal una "fila". Ciertas realizaciones contemplan seis o más columnas de tales pares detectores. En estas realizaciones, habría 12 pares de detectores en total (dos filas de seis) con dos pares detectores por columna, permitiendo 12 detecciones separadas y simultáneas.

Cada fuente de luz, tal como, por ejemplo, la fuente de luz 726a, puede estar configurada para producir luz de una longitud de onda específica a un resto fluorescente específico asociado con, por ejemplo, una sonda, contenida en las cámaras de reacción. Cada detector de luz, tal como, por ejemplo, 726b, puede estar configurado para detectar la luz emitida desde las sondas fluorescentes asociadas con la luz producida por el emisor de luz en el par detector. Los pares detectores pueden configurarse para detectar de forma independiente una pluralidad de restos fluorescentes, por ejemplo, diferentes sondas fluorescentes, que tienen diferentes espectros de emisión fluorescente, en el que, en cada cámara de reacción, la emisión de cada sonda fluorescente es indicativa de la presencia o ausencia de un polinucleótido objetivo particular o un fragmento del mismo. Aunque trayectorias de luz cruzadas se pueden utilizar, una realización utiliza un par de detector y emisor, donde cada uno está en contacto óptico directo con la cámara de reacción, preferiblemente de forma simultánea en dicho contacto. Opcionalmente, el detector y el emisor de un par están alineados con la cámara de reacción a lo largo de líneas que se cruzan sustancialmente en un ángulo agudo en la cámara de reacción. El ángulo puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente 5 y 70 grados, preferiblemente entre aproximadamente 8 y 60 grados, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y 50 grados.

En algunas realizaciones, el cabezal de detector incluye dos filas de pares de fotodetector y fuentes de luz que se corresponden con dos filas de cámaras de reacción de cartuchos de microfluído, cuando está presente en el aparato. Por ejemplo, el cabezal de detector puede incluir una primera fila o superior de seis pares de fotodetector y fuente de luz, y una segunda, o la última, fila de pares de fotodetector y fuente de luz, que están configurados para consultar la primera y segunda filas de las cámaras de reacción dentro de un cartucho de microfluído, respectivamente.

La figura 6 ilustra un posible diseño de disposición de fotodetector y fuente de luz implementado en ciertas realizaciones del detector. La primera columna comprende emisores de luz ROX 201a, 201b y correspondientes detectores 207a, 207b. La segunda columna comprende emisores de luz HRM 201c, 201d y correspondientes detectores 207c, 207d. La tercera columna comprende emisores de luz CY5 201e, 201f y correspondientes detectores 207e, 207f. La cuarta columna comprende emisores de luz FAM 201g, 201h y correspondientes detectores 207g, 207h. La quinta columna comprende emisores de luz Q705 201i, 201j y correspondientes detectores 207i, 207j. La sexta columna comprende emisores de luz VIC 201k, 201l y correspondientes detectores 207k, 207l. En algunos casos, los detectores y emisores se seleccionan con referencia a fluoróforos particulares para ser utilizados en un ensayo. En la realización ilustrada en la figura 6, la primera fila o superior de pares de detector y fuente de luz comprende una pluralidad de pares de fotodetector y fuente de luz, por ejemplo, los emisores 201a, 201c, 201e, 201g, 201i, y 201k y los detectores 207a, 207c, 207e, 207g, 207i, y 207k. La segunda fila o inferior de pares de detector y fuente de luz comprende una pluralidad de pares de fotodetector y fuente de luz, por ejemplo, los emisores 201b, 201d, 201f, 201h, 201j, y 201l y los detectores 207b, 207d, 207f, 207h, 207j, y 207l. Un resumen de las propiedades de los emisores y detectores de ejemplo se muestra en la Tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Color (Especimen)	Tinte (Ensayo)	Nombre longitud de onda (Ex/Em)	Software	CT#
Verde	FAM	470/510	FAM	4
Amarillo	TET, VIC	530/555	Vic	6
Naranja	Rojo Texas, ROX	585/610	Rojo Cal/ROX	1
Rojo	Cy5	625/660	Cy5	3
Carmesí	Cy5.5	680/715	Cy5.5	5
ultravioleta	nulo	ultravioleta	HRM	2

La disposición ejemplar de fotodetectores y fuentes de luz representada en la figura 6 puede inhibir la diafonía entre columnas de detección. Es decir, la longitud de onda para cada par de detectores de emisor se puede seleccionar para poseer un mínimo solapamiento con sus pares emisor-detector vecinos. Así, por ejemplo, donde CT# se refiere a la columna de un par emisor-detector particular, en un cabezal detector de 6 columnas, Ex es la longitud de onda de excitación de un fluoróforo, y Em es la longitud de onda de emisión, será evidente que las longitudes de onda de emisión adyacente no son adyacentes entre sí en el cabezal de detector. Que el tinte de HRM de la fila es nulo solamente indica que se pueden usar una variedad de tintes, que no son necesarios para este ejemplo particular. En algunas realizaciones, HRM se refiere a una "fusión de alta resolución" y una fuente de luz correspondiente para este fotodetector puede comprender un LED que opera en el espectro ultravioleta. Se reconocerá que las columnas pueden disponerse en variaciones alternativas y que las selecciones alternativas de fuentes de emisión de luz y detectores pueden sustituirse por las mostradas.

Los pares de emisor de luz y fotodetector de cada columna se pueden calibrar utilizando la placa normalizadora. Después de la calibración, el cabezal de detector se puede mover a una posición tal que una primera columna de los pares emisor de luz y fotodetector está situada sobre un primer grupo de carriles, de manera que cada par emisor de luz y fotodetector tiene acceso a una cámara de reacción de los carriles. La detección de las cámaras de reacción en el primer grupo de carriles a continuación se realizará utilizando la primera columna de emisores/detectores. A continuación, el cabezal de detector se puede mover a una segunda posición, tal que la primera columna está sobre un segundo grupo de carriles y la segunda columna está sobre el primer grupo de carriles. La detección de las cámaras de reacción en el segundo grupo de carriles a continuación se realizará utilizando la primera columna de emisores/detectores y la detección de las cámaras de reacción en el primer grupo de carriles luego se realizará utilizando la segunda columna de emisores/detectores. El proceso puede continuar hasta que cada columna ha pasado sobre cada carril. Por lo tanto, para N columnas de detectores y M columnas de cámaras, el detector realizará detecciones para al menos $M + N - 1$ posiciones. Por ejemplo, en las realizaciones de la figura 11 hay 6 columnas. Para un cartucho que comprende 12 carriles, el detector tendría que moverse entre al menos 17 posiciones (18 si se considera la posición de calibración).

La figura 7 representa los resultados finales después de la operación de ciertas de las realizaciones. Se trazan los niveles de fluorescencia detectados para cada par emisor de luz - fotodetector 801-805 a lo largo del tiempo para una sola cámara de reacción (o reactor) asociado a un solo carril. Después de un número suficiente de iteraciones (aproximadamente 30 en este ejemplo) del protocolo de recocido y de desnaturalización, los detectores identifican un aumento de los niveles de fluorescencia dentro del reactor.

Placa de la cámara

Algunas de las presentes realizaciones se refieren a la placa circundante y que incluye la capa de cámara. En particular, ciertas realizaciones contemplan la fabricación de una capa de abertura que comprende características que facilitan ventajosamente resultados consistentes a través de ensayos de la unidad de calentamiento/detección, como se describe en más detalle a continuación.

La figura 8 ilustra la disposición de la placa que se encuentra en ciertas realizaciones del módulo óptico del termociclador de exploración y la bandeja de recepción asociada y el cartucho. Cuando el cartucho se pone dentro de la proximidad de la capa de la abertura 540 del módulo óptico 500a, la capa térmica 600, la capa de cámara 200 (que puede comprender un sustrato de cámara), y la capa de abertura 540 pueden estar situadas como se representa en la realización de la figura 8. Como se describió anteriormente, la capa de cámara 200 puede comprender una pluralidad de cámaras de reacción 1703a-d, que pueden estar situadas de manera que se controlen térmicamente por separado entre sí, o en grupos. La capa térmica 600 puede comprender una pluralidad de unidades térmicas 1605a, 1605b, 1605c. La figura 8 es un diagrama de resumen simplificado de la descripción anterior, y ciertas características de la trayectoria de microfluído no se muestran. En ciertas realizaciones, las unidades térmicas pueden estar desconectadas a la vez mecánicamente y térmicamente entre sí (como se ilustra por su separación física en la figura 4). Sin embargo, en otras realizaciones, las unidades térmicas pueden estar cada una colocada dentro de un mismo material de sustrato, pero separadas de tal manera que se mantienen térmicamente desconectadas, como se describió anteriormente. Por lo tanto, es posible que las unidades térmicas estén separadas térmicamente, pero no separadas mecánicamente.

De esta manera, cada unidad térmica puede estar asociada con una o más cámaras de reacción 1703a-d, por separado de las cámaras de reacción restantes. De acuerdo con el protocolo especificado para cada cámara de reacción, las unidades térmicas pueden calentar y/o enfriar sucesivamente su correspondiente cámara apropiadamente. Por ejemplo, la unidad térmica 1605c puede enfriar y/o calentar la cámara 1703a, tal que la temperatura de la cámara 1703a es sustancialmente independiente del estado de enfriamiento y térmico de la cámara 1703a. Aunque el calentamiento puede realizarse mediante corriente a través de un circuito de microfluído o electrónico, el enfriamiento puede ser "pasivo" en que solo la convección entre la cámara de microfluído y se usa para reducir la temperatura de la cámara. Las unidades térmicas 1605a, 1605b, 1605c puede controlarse utilizando un sistema de control de bucle cerrado.

En algunas realizaciones, la placa de abertura 540 puede estar situada sobre la capa de cámara 200 y puede proporcionar presión a la capa de cámara 200 para facilitar el calentamiento y el enfriamiento del cartucho de microfluído, por ejemplo, la capa de cámara, mediante la capa térmica 600. La placa de abertura puede incluir una pluralidad de aberturas 557a-d para facilitar la observación de cada fotodetector 726b de unas cámaras de reacción 1703a-d individuales. En ausencia de placa de abertura 540, y dependiendo de la configuración de la capa térmica 600 y la capa de cámara 200, la capa de cámara 200 puede "deformarse" y/o ser lo suficientemente flexible de manera que la comunicación térmica entre las cámaras y las respectivas unidades térmicas es inconsistente. El calentamiento y el enfriamiento inconsistentes pueden provocar una ejecución menos precisa de los protocolos y unos resultados menos precisos y exactos. Como se describió anteriormente, una deformación significativa puede restringir el cabezal óptico de movimiento lateral. Por lo tanto, el espesor de la placa de abertura debe seleccionarse apropiadamente para facilitar una trayectoria de luz adecuada entre cada cámara de reacción y las fuentes de luz y los fotodetectores, garantizando al mismo tiempo el calentamiento y el enfriamiento adecuados de la capa de cámara. Si la capa de abertura es demasiado gruesa, la distancia desde el fotodetector 726b a la cámara puede ser demasiado grande, atenuando la lectura de la fluorescencia de manera no deseada desde la cámara de reacción. Además de aumentar la distancia a la cámara de reacción, una capa de abertura 540 que es demasiado gruesa o demasiado pesada pondrá demasiada presión en la cámara de reacción, haciendo que la convección sea demasiado grande. A la inversa, si la capa de abertura 540 es demasiado delgada, no puede evitar que la capa de cámara 200 se doble y se deforme, y la propia capa de abertura 540 se puede doblar y deformar. La deformación de las aberturas 557a-d o las cámaras 1703a-d pueden desviar la luz desde la fuente de luz 726a y evita lecturas precisas mediante el fotodetector 726b.

En consecuencia, las realizaciones descritas en el presente documento proporcionan capas de abertura que evitan ventajosamente los inconvenientes descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, la capa de abertura 540 está hecha, al menos en parte, de acero. En estas realizaciones, el acero proporciona la resistencia adecuada, la densidad y la resistencia a la deflexión deseada para la operación. Además, el acero puede proporcionar una baja auto-fluorescencia y, por lo tanto, es menos probable que afecte negativamente la lectura del fotodetector 726b. El acero también puede ser tratado electroquímicamente para disminuir su auto-fluorescencia y, de ese modo, ser menos probable que afecte adversamente a la lectura del fotodetector. En ciertas realizaciones, la capa de abertura puede comprender en su lugar níquel negro (Ni), es decir, Ni con un colorante añadido a la misma para reducir la auto-fluorescencia. Ciertas realizaciones contemplan combinaciones de estos diferentes materiales y tratamientos electroquímicos. En ciertas realizaciones, la capa de abertura 540 está hecha de aluminio y cuando se fija mediante los paneles de soporte adyacentes 500, 506, y 546, proporciona la resistencia adecuada. El aluminio puede estar chapado electroquímicamente con un acabado de óxido anódico, por ejemplo, con un colorante negro añadido de reducir la auto-fluorescencia.

La óptica de iluminación puede diseñarse de modo que la luz de excitación que cae sobre la cámara de reacción, o reactor, es incidente a lo largo de un área que es similar a la forma del reactor. Como el reactor puede ser largo y estrecho, el punto de iluminación también puede ser largo y estrecho, es decir, también extendido. Por lo tanto, la forma de las aberturas 557a-d puede estar diseñada con consideración a las dimensiones de la cámara de reacción por debajo, así como a las posiciones relativas del correspondiente emisor de luz y fotodetector. La longitud del punto puede ajustarse mediante la alteración de un número de factores, incluyendo: el diámetro de la perforación donde se coloca el fotodetector 726b (el tubo que contiene el filtro y la lente puede tener un efecto de abertura); la distancia del fotodetector 726b del reactor de PCR; y el uso de lentes adecuadas en el fotodetector 726b.

Elemento de fuerza

En ciertas realizaciones, la bandeja de recepción 520 coloca la capa de cámara 200 en proximidad a la capa térmica 600 o la capa de abertura 540, pero no acopla mecánicamente y/o de ese modo coloca las capas en contacto entre sí. De esta manera, la capa de cámara 200 puede estar acoplada térmicamente, pero no mecánicamente, a la capa térmica 600. En otras realizaciones, la bandeja de recepción coloca la capa térmica 600 en contacto mecánico y térmico con la capa de cámara 200 y la capa de cámara en contacto mecánico con la capa de abertura 540. En diversas realizaciones, el aparato puede incluir uno o más elementos de la fuerza (no mostrados) que están configurados para aplicar presión a la bandeja de recepción 520 para acoplar térmicamente las fuentes de calor al cartucho microfluído 200 colocado en la bandeja de recepción 520. La aplicación de presión puede ser importante para garantizar un contacto térmico consistente entre el sustrato calentador y las cámaras de reacción, puertas y válvulas, etc., en el cartucho microfluído 200. Cuando la bandeja de recepción 520 está en una posición cerrada, con lo cual se coloca debajo de la placa de abertura 540 del módulo óptico 502, el elemento de fuerza, tal como un conjunto de motor, por debajo de la bandeja de recepción 520, puede comenzar a desplazarse hacia arriba, hacia el módulo óptico 502, llevando así la bandeja de recepción 520 más cerca del módulo óptico 502. A medida que la bandeja de recepción 520 se desplaza hacia arriba hacia el módulo óptico 502, el cartucho 200 puede empezar a entrar en contacto con una superficie inferior de la placa de abertura 540. El cartucho 200 puede seguir desplazándose hacia arriba hasta que una presión suficiente se recibe en el cartucho 200. Como se describió anteriormente, la placa de abertura 540 puede aplicar una presión igual en todos los puntos de la parte superior del cartucho 200 y, por lo tanto, presiona el cartucho 200 contra el sustrato de calentador 600 con una presión uniforme. Como se ha descrito, la capa de abertura puede seleccionarse para poseer propiedades que facilitan esta operación.

Por ejemplo, la selección del material de la placa de abertura 540 puede proporcionar muy poca desviación del cartucho 200, cuando se presiona contra la misma.

La aplicación de una presión uniforme del cartucho 200 contra el sustrato de calentador 600 puede permitir un calentamiento uniforme para cada uno de los componentes del cartucho cuando se desee. Aunque la presión y el contacto uniformes pueden obtenerse entre los calentadores en el sustrato de calentador 600 y los componentes (válvulas, puertas, cámaras, etc.) de las redes microfluidas en el cartucho 200, los calentadores no necesariamente se activan simultáneamente, como se describió anteriormente. En ciertas realizaciones, la aplicación de una presión uniforme no da lugar necesariamente a una igualdad de calentamiento de diferentes componentes del cartucho 200. En algunas realizaciones, la activación de un calentador específico en el sustrato de calentador 600, junto con la presión aplicada por la placa de abertura 540 al cartucho 200 activan un componente particular del cartucho 200.

Las figuras 9A-H son diagramas de las dimensiones de una posible realización de la placa de abertura. En esta realización, un recubrimiento de conversión química se puede aplicar para ajustar las propiedades de reflexión de la capa de abertura. Algunas porciones 9002 pueden seleccionarse para no recibir el recubrimiento de conversión química. El recubrimiento se puede aplicar a la superficie de la placa 540 o depositarse a lo largo de su material. En algunas realizaciones, el material de la placa 540 puede comprender acero. En otras realizaciones, la placa 540 puede comprender aluminio. En aún otras realizaciones, el material de la placa 540 puede comprender níquel. En algunas realizaciones, el material de la placa puede ser una combinación de dos o más materiales, incluyendo, por ejemplo, aluminio, níquel, o acero.

En la realización mostrada en las figuras 9A-H, las dimensiones de la placa han sido seleccionadas para satisfacer las limitaciones en cuanto a presión de la cámara y la trayectoria óptica a los pares de detectores descritos anteriormente. El espesor del material de la placa 540 comienza en 0,3125 pulgadas y se mecaniza hasta el espesor deseado. Como se ha indicado, la mayor parte de la placa comprende un espesor de aproximadamente 0,25 pulgadas. Sin embargo, este espesor puede variar, por ejemplo, el espesor sobre las aberturas de apertura 557 puede ser de 0,19 pulgadas. Como se describió anteriormente, el espesor de la abertura de apertura facilita una trayectoria óptica sin obstáculos entre el fotodetector y la fuente de luz al contenido de la cámara de reacción.

En general, las dimensiones de la placa de abertura 540 se seleccionan de tal manera que en combinación con las propiedades de los materiales que constituyen la placa de abertura 540, la placa 540 proporciona una presión suficiente a la placa de la cámara subyacente para facilitar el calentamiento y la refrigeración adecuados, así como una rigidez suficiente para evitar la deformación de la placa de la cámara. Esta deformación puede provocar obstrucciones a la fuente de luz y a la trayectoria óptica del fotodetector a la cámara de reacción. Simultáneamente, las dimensiones de la placa no deben imponer una distancia desfavorable desde la cámara de reacción de la capa de la cámara al par de fuente de luz y fotodetector a través de las aberturas 557. Las dimensiones de la placa de abertura 540 tampoco deben obstruir la trayectoria óptica desde el par de fuente de luz y fotodetector al contenido del reactor de la cámara.

En algunas realizaciones, la placa normalizadora 546 puede estar unida a la placa de abertura mediante la inserción de tornillos en posiciones 9001, u otro medio de fijación a través de una abertura. En otras realizaciones, estas posiciones pueden facilitar técnicas de calibración más amplias a través de las aberturas sobre las placas normalizadoras que con respecto a las aberturas restantes.

La figura 10 ilustra diversas dimensiones de las perspectivas de la placa de abertura de las figuras 9A-H. Como se describió anteriormente, en esta realización, un recubrimiento de conversión química puede aplicarse primero para evitar que los materiales de base, por ejemplo, aluminio, níquel o acero, se oxiden, mientras también proporcionan una mejora de conexión eléctrica a tierra para una operación electrónica adecuada. Solamente las superficies que puedan estar expuestas a la operación óptica se recubren selectivamente con anodización negra.

Consistencia de análisis de diagnóstico

Algunas de las presentes realizaciones contemplan métodos para garantizar análisis de diagnóstico consistentes a través de ensayos dentro del mismo calentador/detector y a través de diferentes calentadores/detectores. En particular, se divulgan realizaciones de un sistema y proceso para la determinación de la duración y compensaciones para una pluralidad de protocolos de PCR para sincronizar la detección entre los mismos. Además, se describen métodos para ajustar el tiempo de refrigeración del reactor para asegurar unos resultados más consistentes.

La figura 11 es un perfil de temperatura para una cámara de reacción que se somete a un protocolo particular 2000. Como se ilustra anteriormente, el sistema en operación puede comprender muchos protocolos diferentes de muchas duraciones diferentes que operan simultáneamente en diferentes cámaras de reacción. El protocolo 2000 implica una pluralidad de ciclos de calentamiento/enfriamiento idénticos, donde cada ciclo comprende mesetas desnaturalizantes 2000B y mesetas de recocido 2000D, donde la temperatura se mantiene constante durante un período de tiempo. Estos ciclos pueden ir precedidos de un ciclo no periódico del protocolo, tal como un período de incubación. En ciertas realizaciones, el protocolo se puede especificar como una colección de temperaturas y

períodos de tiempo. Es decir, el protocolo puede especificar inicialmente solamente que la cámara se mantendrá a 95 °C durante la duración B y después se mantiene a 61 °C durante la duración D. Ciertas realizaciones contemplan la agrupación de estos segmentos en "etapas" y "sub-etapas" para facilitar el control de usuario y automatizado. Por ejemplo, el ciclo de calentamiento y enfriamiento 2000B y D puede denominarse como una "etapa" con la duración B a 95 °C y la duración D a 61 °C se hace referencia como "sub-etapas". En ciertas realizaciones, un usuario puede especificar las duraciones de las sub-etapas. En otras realizaciones, estas duraciones pueden recuperarse de una base de datos. Típicamente, estos tiempos se establecen ya sea desde un protocolo estándar o mediante una entrada de usuario, a veces utilizando una "receta" establecida de temperaturas y tiempos de meseta. Además de estas sub-etapas, el perfil de temperatura del protocolo también comprenderá transiciones, tal como la transición 2000A de 61 °C a 95 °C y la transición 2000C de 95 °C a 61 °C. La duración de estas transiciones puede ser una consecuencia de los materiales y el entorno de la cámara de reacción y de la naturaleza de los elementos de calentamiento empleados.

En ciertas realizaciones, la trayectoria térmica para el calentamiento y el enfriamiento puede determinarse para la totalidad de la reacción antes del inicio de la ejecución. En algunos sistemas, el contorno de la temperatura en función del tiempo se controla y se ajusta durante toda la reacción para minimizar las temperaturas de transición, y teniendo en cuenta las variaciones en las eficiencias de los diferentes elementos de calentamiento. En otras palabras, algunos sistemas utilizan bucles de control de retroalimentación para conducir a una temperatura objetivo, en el que el contorno real de la relación de tiempo de la temperatura puede variar de ciclo a ciclo. Tales ajustes pueden dar lugar a diferentes tiempos de reacción global, y, más importante, diferentes eficiencias de reacción en conjunto. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los sistemas y los métodos descritos en este documento proporcionan ventajosamente sistemas en los que el contorno de la temperatura respecto a la relación de tiempo de la reacción completa para cada cámara de reacción independiente (o grupo de cámaras) se establece de manera predeterminada antes del inicio de la ejecución. Esto no solo permite de manera ventajosa la sincronización de las múltiples etapas de detección a través de una pluralidad de diferentes reactores, sino que también permite un control más estricto sobre los parámetros que minimizan las diferencias en eficacias de reacción que pueden surgir como resultado de diferentes contornos de temperatura/tiempo. En algunas realizaciones, los sistemas y métodos proporcionados en este documento proporcionan el informe de errores al final de una reacción, si la temperatura medida es diferente del valor esperado cuando se ha completado una ejecución.

En varios puntos en el perfil de temperatura de protocolo 2000, el usuario o la receta puede especificar que se produzca una detección. Por ejemplo, para algunos protocolos, se puede solicitar una detección al final del segmento 2000D. Si se especifican detecciones arbitrariamente en cada protocolo, el cabezal detector tendría que desplazarse entre las posiciones de una manera ineficaz, e incluso puede resultar imposible realizar detecciones en los momentos requeridos. Es decir, si cada uno de una pluralidad de protocolos se inicia simultáneamente y se ejecuta en paralelo simultáneamente a través de cada una de las cámaras de reacción en el cartucho, sería muy ineficiente para el detector satisfacer las solicitudes de detección de cada protocolo. En particular, una vez que se había completado la calibración, el detector tendría que desplazarse primero a posiciones adecuadas para realizar detecciones para cada par fuente de luz-detector en su conjunto para el primer perfil. En el momento en que el detector ha terminado, sin embargo, cada uno de los protocolos restantes entrarán en un período en el que la detección no se va a realizar. Por lo tanto, habrá un período de "tiempo muerto" cuando el detector no puede realizar ninguna detección y debe estar inactivo, simplemente a la espera de la oportunidad de realizar la siguiente detección. Este "tiempo muerto" es ineficiente y prolonga innecesariamente el proceso de diagnóstico. Además, cuando se realizan detecciones sucesivas, el "tiempo muerto" puede generar detecciones irregulares y aperiódicas de la misma cámara, posiblemente introduciendo lecturas inconsistentes.

Algunas de las presentes realizaciones contemplan ajustes automatizados a porciones del perfil 2000 para facilitar la detección eficiente a través de múltiples protocolos. Esto se puede lograr permitiendo que el usuario edite, o que el sistema pueda editar de forma automática, la longitud del segmento 2000B o 2000D.

Debe entenderse que, mientras se produce al menos un tiempo mínimo de meseta, alguna extensión menor de tiempos de meseta se puede alojar en la mayoría de los protocolos de amplificación. Esta flexibilidad se utiliza para todos los alojamientos eficientes de los diferentes ensayos que se realizan de forma simultánea, mientras se realiza la monitorización en tiempo real de la amplificación mediante la lectura de los diversos ensayos utilizando un cabezal detector de exploración.

Si la detección iba a realizarse durante el segmento 2000B, por ejemplo, el sistema o el usuario podrá ampliar la duración del segmento 2000B según sea necesario para acomodar el movimiento del cabezal detector y para coordinar la lectura de una pluralidad de ensayos que se realizan simultáneamente. La duración de los segmentos 2000A y 2000C se puede calcular utilizando una velocidad de enfriamiento estándar predeterminada desde las temperaturas anteriores y que se incorporan en el análisis. Algunas realizaciones no permiten al usuario editar estos segmentos y, en cambio, se registran mediante el sistema internamente.

En ciertas realizaciones, los ajustes de protocolo determinados por el sistema pueden comprender al menos tres formas separadas. El primer ajuste puede comprender un "ajuste entre ciclos" en el que mesetas tales como 2000B y 2000D del protocolo se extienden de tal manera que todo el ciclo de las etapas 2000A-D alcanza una duración

deseada, en algunos casos un múltiplo entero de un tiempo de ciclo de detección. Este ajuste se describe con respecto a la figura 13. Una vez que el ajuste de entre ciclos está completo, el sistema puede entonces realizar un "ajuste entre ciclos". Un ajuste entre ciclos puede garantizar que los eventos de detección dentro de cada ciclo se producen en múltiplos enteros de una duración deseada separados entre sí (tal como un múltiplo entero del tiempo de ciclo de detección) entre los ciclos. Estos ajustes se describen con respecto a la figura 14. El tercer ajuste puede comprender un "empezar ajuste de desplazamiento" que puede depender solamente del carril utilizado para la ejecución del protocolo. Estos ajustes se describen con respecto a las figuras 15A-C.

Visión general del ajuste del protocolo

La figura 12 representa un diagrama de flujo de un proceso 4000 utilizado en algunas de las realizaciones divulgadas para determinar una solución apropiada para los tiempos de detección del detector y los perfiles de protocolo. El proceso 4000 puede implementarse en software, hardware, firmware o una combinación de los dos. Por ejemplo, el proceso se puede implementar en cualquiera de un FPGA, un microcontrolador, o software que se ejecuta en un procesador de ordenador. Porciones del proceso pueden realizarse mediante un procesador de propósito general, tal como un microcontrolador, mientras que otras porciones pueden realizarse mediante hardware dedicado, software, o sistemas de firmware. El proceso comienza en 4001 mediante la determinación de un tiempo de ciclo de detección (o usando un tiempo de ciclo de detección predeterminado, por ejemplo, ya en la memoria) para el sistema 4002. El tiempo de ciclo de detección puede comprender el tiempo que se requiere para que el detector se mueva a cada una de las posiciones de detección (detección con cada uno de los pares de emisor/detector en un cabezal de detección en cada una de las seis columnas de la figura 6), realizar todas las detecciones necesarias, y volver a una posición inicial. Opcionalmente, el usuario o sistema pueden permitir hacer ajustes en el procedimiento de detección para modificar el tiempo de ciclo de detección. Por ejemplo, el usuario puede desear solamente realizar la detección utilizando un subconjunto de los detectores. En algunas realizaciones, el tiempo de ciclo de detección es de aproximadamente 10 segundos, cuando la realización comprende seis columnas de pares de detectores y se utilizan las seis columnas.

En algunas realizaciones, el proceso puede determinar primero una pluralidad de "ajustes entre ciclos" para uno o más de los protocolos 4003. Como se describe más adelante con respecto a la figura 13, las duraciones de una etapa o sub-etapa pueden comprender el tiempo para realizar una etapa o sub-etapa particular en el protocolo. Los tiempos de ciclo pueden determinarse mediante una combinación de especificaciones del usuario y restricciones del sistema identificado. En ciertas realizaciones, el sistema requerirá que la pluralidad de tiempos de ciclo sean múltiplos enteros del tiempo de ciclo de detección. "Ajustes entre ciclos" se pueden introducir para satisfacer esta restricción. Por ejemplo, si el tiempo de ciclo de detección era de 12,2 segundos, los tiempos de ciclo para una etapa del protocolo pueden ser de 22,4, 33,6, 44,8, o cualquier otra duración de $N \times 12,2$, donde N es un número entero mayor que 0. En algunas realizaciones, solo es necesario imponer esta restricción cuando se realiza una detección en el ciclo.

Por lo tanto, los ajustes entre ciclos aseguran que el ciclo del protocolo es un múltiplo entero del tiempo del ciclo de detección. Sin embargo, una detección puede solicitarse en cualquier punto dentro de un ciclo. Si el tiempo del ciclo de detección es de 10 segundos, entonces el más temprano en que puede realizarse una detección es a los 10 segundos después de iniciados los protocolos. Las detecciones pueden entonces realizarse en múltiplos enteros después de ese tiempo (20, 30, 40 segundos, etc.).

De este modo, un nuevo ajuste, un ajuste "entre ciclos" 4004, se puede determinar entonces para asegurar que la detección solicitada se produce en el momento apropiado. Estos "ajustes entre ciclos" se pueden incorporar en el protocolo como retrasos adicionales entre las etapas o sub-etapas del protocolo. Dicho de otra manera, un protocolo de PCR, una vez sometido a ajustes "entre ciclos" puede comprender etapas del ciclo "válidas". El protocolo de PCR puede entonces generarse mediante el encadenamiento de cada una de las etapas y la adición de transiciones de etapa a etapa. Los "ajustes entre ciclos" 4004 aseguran que los tiempos de detección se producen en los múltiplos enteros deseados del tiempo de ciclo de detección después de que los ciclos se hayan encadenado juntos.

Por ejemplo, para un sistema que tiene un tiempo de ciclo de detección de 10 segundos, un protocolo puede comprender una etapa que tiene su primera detección a los 18 segundos en un ciclo. La duración del ciclo (la duración de toda la etapa) puede durar 30 segundos (tal vez después de un ajuste "entre ciclos"). Por lo tanto, mientras que el tiempo de ciclo en su conjunto esté correctamente alineado con el tiempo de ciclo de detección de 10 segundos ($3 \times 10 = 30$ segundos) la primera detección por sí misma no está correctamente alineada con la detección (18 segundos no es un múltiplo de 10 segundos). El sistema añadirá 2 segundos de ajuste "entre ciclos" a la primera ejecución de detección, de manera que la primera detección se produce 20 segundos después del inicio del protocolo. Esto se puede hacer mediante la extensión de la temperatura de mantenimiento final de la etapa anterior durante 2 segundos adicionales a través de un "ajuste de relleno". Si no haya ninguna etapa anterior, el sistema insertará un mantenimiento de 2 segundos a temperatura ambiente hasta el comienzo de la primera ejecución del ciclo. Por lo tanto, si el sistema comienza la operación en T0, la primera detección se producirá a T0 + 20 segundos, la segunda detección a T0 + 50 segundos, y así sucesivamente.

Debido a los ajustes entre y dentro de los ciclos, el protocolo es ahora en una forma tal que solo se solicitarán detecciones en momentos convenientes para el cabezal del detector para moverse a la cámara de reacción que realiza el protocolo. Si todos los protocolos realizan en cámaras de reacción situadas en la primera columna del cartucho (y el número suficiente de detectores presentes en el cabezal del detector), ajustes entre y en los ciclos en solitario serían suficientes para modificar adecuadamente el protocolo para una detección eficiente (una primera columna aquí refiriéndose a una columna de carriles tal como los carriles 1706a y 1706b con cámaras asociadas 1703a y 1703b en la figura 3A). Sin embargo, como los protocolos operan en diferentes columnas del cartucho, es necesario además desplazar el inicio del protocolo para compensar el retraso del cabezal del detector para alcanzar la ubicación de la cámara.

Por lo tanto, "desplazamientos de ajuste iniciales" se añaden al protocolo basado en la ubicación de la cámara en la que se realiza el protocolo. Estos "desplazamientos de ajuste iniciales" 4005 se describen con mayor detalle con respecto a las figuras 15A-C. En algunas realizaciones, estos ajustes se realizan en tiempo de ejecución y se basan únicamente en la ubicación del carril de ejecución. Por ejemplo, ningún ajuste puede ser necesario para un protocolo que se ejecuta en los carriles situados en una primera columna de la cámara, de modo que una ejecución de protocolo en las cámaras de estos carriles tendrá un tiempo de retraso de +0 segundos. Cada columna posterior de carriles gana un retardo de 400 milisegundos para su distancia desde la primera columna, debido al tiempo requerido para las detecciones (dos detecciones en 100 milisegundos cada una, realizadas de forma asíncrona en esta realización) y el movimiento del motor del detector (200 milisegundos). En este ejemplo, con un tiempo de ciclo de detección de 10 segundos, la primera detección posible para cada columna de carriles es la siguiente: la columna 1 tiene su primera detección en 10 segundos, la columna 2 tiene su primera detección en 10,4 segundos, la columna 3 tiene su primera detección en 10,8 segundos, etc. Al retrasar el inicio de un protocolo correctamente alineado por el tiempo necesario para un carril particular, puede mantener la alineación esperada. Aunque este ejemplo particular asume que el protocolo ya está alineado (a partir de los ajustes 4003 y 4004), el experto en la técnica apreciará fácilmente que otras realizaciones pueden determinar los desplazamientos que anticipan futuros ajustes.

Aunque se ha descrito en el orden de las etapas 4003, 4005 y 4004, se reconocerá fácilmente que estas etapas pueden ordenarse en cualquier otro orden adecuado, y tampoco se necesita que el sistema realice cada etapa sucesivamente. En algunas realizaciones, sin embargo, tal como se describe anteriormente, puede ser necesario realizar ajustes entre ciclos después de realizar ajustes en los ciclos, ya que el ajuste entre ciclos depende de la modificación en los ciclos. Por el contrario, el ajuste de desplazamiento inicial 4005 no puede depender de ninguna determinación anterior. Es decir, en algunas realizaciones, el desplazamiento inicial 4005 se debe determinar solamente una vez en el tiempo de ejecución, mientras que los ajustes en los ciclos 4003 y los ajustes entre ciclos 4004 pueden realizarse para cada etapa del ciclo en los protocolos.

En algunas realizaciones, una vez que los tiempos de protocolo se han ajustado correctamente, el proceso puede entonces iniciar los protocolos 4006. En algunas realizaciones, un procesador puede simplemente colocar los desplazamientos en una ubicación de memoria para su recuperación mediante un componente dedicado separado del sistema que por sí mismo inicia cada protocolo.

Ajuste en los ciclos

Los "ajustes en los ciclos" comprenden ajustes en intervalos de etapa o sub-etapa, tal como se puede especificar por parte de un usuario o recibirse desde una base de datos, de modo que la etapa en su conjunto es un múltiplo entero de una duración predeterminada. Con referencia a la figura 13, en ciertas realizaciones, el usuario puede especificar ciertas características del perfil de protocolo, tal como los tiempos deseados para una sub-etapa del protocolo, usando una interfaz de usuario, o interfaz gráfica de usuario (GUI). En algunas realizaciones, el sistema puede entonces validar la selección del usuario. Después de calcular longitudes de segmento para cada una de las sub-etapas, el software del sistema validará el tiempo de ciclo de la etapa e indica si cualquier ajuste es necesario. En algunas realizaciones, un tiempo de ciclo de etapa "válida" es un tiempo de ciclo de etapa que es un múltiplo entero del tiempo de ciclo de detección. Si un tiempo de ciclo de etapa no es válido, el usuario puede solicitar hacer ajustes para esa etapa 5003b. Si no es necesario ningún ajuste, el usuario puede ser notificado de que la etapa está alineada correctamente 5003a.

En el ejemplo de la figura 13, el usuario ha requerido una etapa de incubación 5001 que comprende una única sub-etapa de 900 segundos. El usuario ha solicitado que la etapa 5001 se produce solo una vez 5010 y, por lo tanto, comprende un solo ciclo de etapa. En este ejemplo, el ciclo de detección comprende 10 segundos. El usuario no ha especificado que se vaya a realizar alguna detección y, en consecuencia, la etapa es válida, puesto que la etapa no requerirá que se ajuste la posición del cabezal del detector. Cuando no se solicita ninguna detección, el sistema registra los intervalos de tiempo solicitados, para futuras consideraciones de desplazamiento, pero no puede imponer ninguna restricción de que el intervalo de tiempo sea un múltiplo del tiempo de detección (aunque la duración puede considerarse en la determinación de un ajuste entre ciclos posterior). Sin embargo, sin embargo, en este ejemplo el usuario ha solicitado la detección durante esta etapa, la etapa todavía sería válida si no se incurre en otros retrasos, ya que 900 segundos es un múltiplo del ciclo de detección de 10 segundos. En cualquier caso, en la realización ilustrada, el sistema ha determinado que esta entrada de etapa es válida.

En el ejemplo ilustrado en la figura 13, la etapa de PCR 5002 comprende dos sub-etapas, una primera sub-etapa, donde la cámara se mantiene a 95 °C y otra sub-etapa donde la cámara se mantiene a 61 °C. El usuario ha solicitado que se realicen 45 ciclos de esta etapa 5011. El usuario ha solicitado que la primera sub-etapa dure 2 segundos y que la segunda sub-etapa dure 10,2 segundos, para un total de 12,2 segundos. Como se ha descrito anteriormente con respecto a la figura 7, el sistema puede también haber calculado el tiempo de transición de 95 °C a 61 °C y añade esta duración a las solicitudes de los usuarios. En este ejemplo, el calentamiento desde 61 °C a 95 °C requiere 4,25 segundos y el enfriamiento de 95 °C a 61 °C en 7,05 segundos. Estos valores pueden almacenarse internamente en la memoria del sistema o determinarse dinámicamente basándose en las entradas del usuario. Finalmente, en algunas realizaciones, cuando se solicita una detección para una sub-etapa 5004, como el usuario ha solicitado aquí, el sistema añade un retardo adicional al tiempo de espera para que la sub-etapa. En este ejemplo, ese retraso es de 2,2 segundos, que cuenta el tiempo mínimo requerido para permitir que el detector se mueva y detecte con cada una de seis columnas de pares emisor de luz-fotodetector en el cabezal del detector. Es decir, en este ejemplo, cada detección de color requiere 200 milisegundos de tiempo de exposición y 200 milisegundos para mover el motor entre las columnas (5 transiciones * 200 ms + 6 detecciones * 200 ms = 2,2 segundos).

Por lo tanto, la duración total de la etapa en conjunto es:

$$4,25 \text{ (calentamiento)} + 2,0 \text{ (desnaturalización)} + 7,5 \text{ (enfriamiento)} + 10,2 \text{ (recocido)} + 2,2 \text{ (detección)} = 25,7 \text{ segundos}$$

Como 25,7 segundos no es un múltiplo del tiempo de detección de 10 segundos, será necesario un ajuste. Como se indica en 5003b, el sistema informa al usuario que se pueden eliminar 5,7 segundos de la duración de la etapa o añadir otros 4,3 segundos para alcanzar un múltiplo del tiempo de ciclo de detección (es decir, un múltiplo de 10 segundos). Estos "ajustes de etapa en el ciclo" se incorporarán en el protocolo después de la selección del usuario.

Se reconocerá que el sistema puede considerar una pluralidad de otros factores no indicados en este ejemplo cuando se proporciona al usuario un intervalo de ajuste. Por ejemplo, pueden tenerse en cuenta retrasos adicionales al movimiento del motor o a la preparación de incubación en el análisis del sistema.

Ajustes entre ciclos

Como se mencionó anteriormente, "ajustes entre ciclos" comprenden ajustes en el primer ciclo de una sub-etapa para crear un retraso entre las etapas del ciclo. Los "ajustes entre ciclos" pueden depender de la duración de las etapas anteriores y de la temperatura final de la etapa inmediatamente anterior (si existe). Con referencia a la figura 14, se describirá el "ajuste entre ciclos" 6005 determinado para lograr una ocurrencia adecuada de tiempo de detección.

En algunas realizaciones, el ajuste 6005 se determina determinando primero el tiempo necesario para calentar o enfriar la temperatura desde el final de la etapa anterior a la primera temperatura de la sub-etapa de la etapa siguiente. Si es necesario tiempo adicional para la alineación, la temperatura desde el final de la etapa anterior se puede mantener para este tiempo. Un ejemplo de alineación entre la temperatura final de una etapa de mantenimiento a 75 °C a la primera temperatura de la sub-etapa de 95 °C se muestra en la figura 14. La temperatura se aumenta gradualmente a 8 °C/s desde 75 °C a 95 °C desde los puntos 6001 b a 6001 c, con el tiempo restante requerido para la alineación dedicado al mantenimiento a 75 °C después del final de la etapa anterior, desde los puntos 6001 a a 6001 b. Este período puede indicarse como un "ajuste entre ciclos". Para lograr la continuidad de la alineación de detección entre las etapas, puede ser necesario desplazar (o retrasar) el inicio de un ciclo de etapa después del final de la etapa anterior mediante este "ajuste entre ciclos". El tiempo necesario para calentar o enfriar la temperatura desde el final de la etapa anterior a la primera temperatura de la sub-etapa de la etapa siguiente puede calcularse entonces. Si es necesario para la alineación un tiempo adicional, la temperatura desde el final de la etapa anterior se mantiene durante el tiempo del "ajuste entre ciclos". En algunas realizaciones, el sistema puede tener en cuenta estas consideraciones cuando se recibe la entrada del usuario a través de la GUI 5000 e incorporarlas a la variación propuesta 5003b.

Ajustes de desplazamientos iniciales

La figura 15A ilustra los ciclos iniciales de dos perfiles de protocolo separados 3001 y 3005. En cada uno de estos protocolos, los ajustes entre ciclos y en el ciclo pueden realizarse, pero el desplazamiento inicial aún no se ha aplicado. En este ejemplo, el perfil 3001 incluye una etapa con un tiempo de ciclo de 30 segundos (el intervalo desde el tiempo 0 al tiempo 30). Un tiempo para la detección 3020a, o una solicitud de detección se produce en 30 segundos. Debe tenerse en cuenta que, en virtud de los ajustes entre ciclos descritos anteriormente, un pequeño retraso puede haber sido incluido en el protocolo 3001 justo antes de la primera rampa de calor para la alineación de la primera detección 3020a. Como se describió anteriormente, los ajustes entre ciclos y en el ciclo facilitan las solicitudes de detección que se realizan en múltiplos enteros del tiempo del ciclo de detección. Aquí, para un tiempo de ciclo de detección de 10 segundos, las solicitudes 3020a y 3020b se producen en los múltiplos enteros de 30 y 60 segundos.

El segundo protocolo 3005 incluye un perfil diferente de 3001. El perfil 3005 comprende una etapa de inicialización de una duración de 0 a 30 segundos. El perfil 3005 es seguido entonces por una pluralidad de ciclos de 50 segundos, con la primera detección en 40 segundos. Estos ciclos representan un PCR de 3 temperaturas, que incluye una desnaturalización a alta temperatura, el recocido y la detección a baja temperatura, y después una extensión a una temperatura media. Como antes, el primer ciclo de inicialización puede incluir un retardo pequeño entre ciclos al principio para alineación. Se reconocerá que su retardo entre ciclos se puede insertar en una variedad de posiciones sobre la etapa de inicialización para asegurar la alineación de detección.

La figura 15B ilustra múltiples instancias de los dos protocolos de la figura 15A. Si fuera posible realizar detecciones en todos los carriles en todas las columnas de la cámara al mismo tiempo, los perfiles ilustrados en la figura 15B serían adecuados. Sin embargo, debido al tiempo de retardo necesario para el cabezal del detector para escanear a través de una columna de cámara con cada una de sus columnas de pares de detectores, es necesario desplazar cada uno de los protocolos 3001-3007, en base a la ubicación de la cámara en la que se ejecutan. Para simplificar, cada uno de los protocolos 3001-3007 se presume que se ejecuta en una columna vecina. Si el protocolo 3001 se ejecuta en la primera columna de la cámara, a continuación, el protocolo 3002 se ejecuta en la segunda, 3003 en la tercera, 3004 en la cuarta, etc.

La figura 15C ilustra la ejecución de los protocolos 3001-3007 con los "ajustes de desplazamiento iniciales" 3010-3015 introducidos para asegurar la alineación de detección. Los desplazamientos iniciales demuestran el movimiento del detector a través de los carriles del cartucho y la sincronización de ese movimiento con las detecciones requeridas por cada uno de los protocolos de ejecución. Por lo tanto, el protocolo 3001 solicitará la detección, utilizando la primera columna del cabezal del detector en la solicitud 3020a. Cuando el cabezal del detector se mueve para alinear la segunda columna del cabezal del detector con la cámara del protocolo 3001, primera columna del cabezal del detector se colocará en la cámara de 3002, que, ventajosamente, es ahora también solicita una detección 3021a. Posteriormente, el proceso continúa con la primera columna del cabezal del detector, ahora con la lectura del protocolo 3003 en la solicitud 3022a, la lectura de la segunda columna 3002 y la tercera lectura 3001. Se reconocerá que la inclinación que se ilustra en la figura 15C no es a escala (en algunas realizaciones, la inclinación puede ser del orden de aproximadamente 400 milisegundos), y ha sido ilustrada como se muestra solo para fines de explicación.

De este modo, con los "ajustes iniciales" seleccionados adecuadamente, el sistema puede garantizar tiempos de detección consistentes a través de cada uno de los reactores. Como se ilustra en la figura 15C, las detecciones ordenadas y eficientes se hacen a lo largo de las líneas 3007a-d cuando la solución determinada se implementa mediante el sistema detector. Así, la detección para un reactor particular se producirá al mismo tiempo de ciclo a ciclo. Los detalles de una realización para la determinación de estas soluciones se describen en mayor detalle con respecto a la figura 16.

Enfriamiento activo

En algunas de las realizaciones, mientras el calentamiento de la cámara del reactor está activo, es decir, los calentadores se aplican activamente a la cámara, el enfriamiento de la cámara del reactor puede ser pasiva, donde la convección solo se utiliza para enfriar el contenido del reactor. Para proporcionar también un rendimiento de diagnóstico coherente, algunas de las realizaciones contemplan la participación activa en el proceso de enfriamiento del reactor para garantizar un comportamiento coherente. La figura 16 ilustra un perfil térmico 7001 que comprende un componente de enfriamiento. El perfil 7001 comprende un tiempo de subida 7006, una meseta 7005, y un período de enfriamiento 7002/7003.

La temperatura ambiente en la posición en la que está situada la unidad de calentamiento/detección puede no ser la misma. Es decir, un sistema que opera en el sur de Arizona no puede ser sometido a las mismas temperaturas ambiente como un sistema operativo en el norte de Alaska. Por lo tanto, a la temperatura ambiente más caliente en la que se espera que opere el sistema, el perfil 7001 puede tener una curva de enfriamiento 7003. En un ambiente más fresco, el perfil de enfriamiento 7002 puede resultar en su lugar. Para compensar la diferencia, ciertas realizaciones contemplan monitorizar el perfil de enfriamiento del reactor a través de los sensores de temperatura, posiblemente los descritos con respecto a la figura 3b. Cuando se detectan desviaciones del perfil máximo 7003, se puede aplicar un calentamiento suficiente, de manera que el perfil 7002 en su lugar sigue el perfil 7003. En algunas realizaciones, se puede aplicar calor periódicamente en momentos 7004a-c, mientras que el calor se puede aplicar de forma continua en otras realizaciones. De esta manera, se pueden conseguir perfiles consistentes independientemente de la ubicación geográfica o la temperatura ambiente operativa del termociclador.

Algunas de estas realizaciones aplican la ley de enfriamiento de Newton para determinar cuándo aplicar los calentadores:

$$T(t) = T_a + (T(0) - T_a)e^{-rt}$$

Donde: $T(t)$ es la temperatura en el tiempo t , $T(0)$ es la temperatura inicial, T_a es el parámetro de la temperatura ambiente, r es el parámetro constante de caída, y t es el tiempo. En algunas realizaciones, 50,2 grados centígrados y 0.098 se pueden utilizar como el parámetro de la temperatura ambiente y el parámetro constante de caída, respectivamente. En esta realización, el parámetro de la temperatura ambiente se selecciona para que sea más alta que cualquier temperatura operativa ambiente esperado, permitiendo así un control total sobre el ciclo de enfriamiento mediante la aplicación de al menos una pequeña cantidad de calor durante cada ciclo de refrigeración, independientemente de la temperatura ambiente, para que coincida con el enfriamiento real de la curva de enfriamiento del perfil máximo 7003 en cada caso.

Como se usa en este documento, una "entrada" puede ser, por ejemplo, datos recibidos desde un teclado, rueda, ratón, sistema de reconocimiento de voz u otro dispositivo capaz de transmitir información desde un usuario a un ordenador. El dispositivo de entrada también puede ser una pantalla táctil asociada al monitor, en cuyo caso el usuario responde a las indicaciones en el monitor al tocar la pantalla. El usuario puede introducir información de texto a través del dispositivo de entrada, tal como el teclado o la pantalla táctil.

La invención es operativa con numerosos otros entornos o configuraciones de sistema informático de propósito general o propósito especial. Ejemplos de sistemas, entornos y/o configuraciones bien conocidos que pueden ser adecuados para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, microcontroladores, ordenadores personales, ordenadores servidores, dispositivos de mano o portátiles, sistemas de multiprocesador, sistemas basados en microprocesador, electrónica de consumo programable, PCs de red, miniordenadores, ordenadores centrales, entornos informáticos distribuidos que incluyen cualquiera de los sistemas o dispositivos anteriores.

Como se usa en este documento, "instrucciones" se refieren a etapas implementadas por ordenador para el procesamiento de información en el sistema. Las instrucciones pueden implementarse en software, firmware o hardware e incluyen cualquier tipo de etapa programada realizada por los componentes del sistema.

Un "microprocesador" o "procesador" puede ser cualquier microprocesador convencional de propósito general con uno o varios núcleos, tal como un procesador Pentium®, Intel® Core™, un procesador 8051, un procesador MIPS®, o un procesador ALPHA®. Además, el microprocesador puede ser cualquier microprocesador de propósito especial convencional, tal como un procesador de señal digital o un procesador gráfico. "Procesador" también puede referirse a, pero no se limita a, microcontroladores, matrices de puertas programables (FPGAs), circuitos integrados de aplicación específica (ASICs), dispositivos lógicos programables complejos (CPLDs), matrices lógicas programables (PLAs), microprocesadores, u otros dispositivos de procesamiento similares.

El sistema comprende varios módulos, tal como se describe en detalle a continuación. Como se puede apreciar por parte de un experto ordinario en la técnica, cada uno de los módulos comprende varias sub-rutinas, procedimientos, declaraciones de definición y macros. Cada uno de los módulos está típicamente compilado por separado y enlazado en un solo programa ejecutable. Por lo tanto, la siguiente descripción de cada uno de los módulos se utiliza por conveniencia para describir la funcionalidad del sistema preferido. Por lo tanto, los procesos que se realizan mediante cada uno de los módulos pueden redistribuirse de manera arbitraria a uno de los otros módulos, combinados juntos en un solo módulo, o puestos a disposición en, por ejemplo, una biblioteca de enlaces dinámicos que se puede compartir.

Ciertas realizaciones del sistema pueden ser utilizadas en conexión con varios sistemas operativos, tal como SNOW LEOPARD®, iOS®, LINUX, UNIX o MICROSOFT WINDOWS®, o cualquier otro sistema operativo adecuado.

Ciertas realizaciones del sistema pueden escribirse en cualquier lenguaje de programación convencional, tal como montaje, C, C++, BASIC, Pascal, o Java, y se ejecutan en un sistema operativo convencional, o similar, o cualquier otro lenguaje de programación adecuado.

Además, los módulos o instrucciones pueden almacenarse en uno o más dispositivos de almacenamiento programables, tal como unidades flash, CD-ROMs, discos duros y DVDs. Una realización incluye un dispositivo de almacenamiento programable que tiene instrucciones almacenadas en el mismo.

Aunque los procesos y métodos anteriores se han descrito anteriormente como que incluyen ciertas etapas y se describen en un orden particular, es necesario reconocer que estos procesos y métodos pueden incluir etapas adicionales o pueden omitir algunas de las etapas que se describen. Además, cada una de las etapas de los procesos no necesariamente tiene que realizarse en el orden que se describe.

Las etapas de un procedimiento o algoritmo descritas en relación con los modos de realización divulgados en el presente documento pueden realizarse directamente en hardware, en un módulo de software ejecutado por un procesador o en una combinación de los dos. Un módulo de software puede residir en memoria RAM, memoria flash, memoria ROM, memoria EPROM, memoria EEPROM, registros, un disco duro, un disco extraíble, un CD-ROM o en cualquier otra forma de medio de almacenamiento conocida en la técnica. Un medio de almacenamiento de ejemplo se puede acoplar con el procesador, de modo que el procesador pueda leer información de, y escribir información en, el medio de almacenamiento. En la alternativa, el medio de almacenamiento puede ser integral al

procesador. El procesador y el medio de almacenamiento pueden residir en un ASIC. El ASIC puede residir en un terminal de usuario. En la alternativa, el procesador y el medio de almacenamiento pueden residir como componentes discretos en un terminal de usuario.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para la realización de ensayos de diagnóstico molecular en muestras múltiples en paralelo, comprendiendo el sistema:

una pluralidad de cámaras de reacción (1703);
un cabezal de detector (700) que comprende una pluralidad de pares de fotodetector (726b, 727b) y fuente de luz (726a, 727a) para realizar detecciones en dicha pluralidad de cámaras de reacción;
estando el sistema caracterizado por que comprende además un procesador configurado para realizar lo siguiente:

determinar o proporcionar o acceder a un tiempo de ciclo de detección, siendo el tiempo de ciclo de detección la cantidad de tiempo requerida para realizar una pluralidad predeterminada de detecciones mediante dicho cabezal de detector en dicha pluralidad de cámaras de reacción;
recibir o acceder a una etapa de protocolo (2000B, 2000D) de un protocolo (2000), teniendo la etapa una duración de etapa asociada con la misma, comprendiendo la etapa un tiempo en el que la detección se produce durante la etapa; y
determinar un primer ajuste de la etapa, de tal manera que la duración de la etapa es un múltiplo entero del tiempo de ciclo de detección.

2. El sistema de la reivindicación 1, en el que la etapa de protocolo está asociada con un protocolo de una pluralidad de protocolos, cada uno de la pluralidad de protocolos asociado con al menos uno de una pluralidad de reacciones de ciclo térmico, en el que cada reacción de ciclo térmico comprende una o más etapas de detección, y en el que la determinación de un primer ajuste se basa al menos en parte en un tiempo de una o más etapas de detección asociadas con las reacciones de ciclo térmico de al menos dos o más de la pluralidad de protocolos cuando los dos o más de la pluralidad de protocolos se ejecutan simultáneamente.

3. El sistema de la reivindicación 1, en el que el procesador está configurado además para determinar un segundo ajuste en la etapa, en el que el tiempo para la detección es un múltiplo del tiempo de ciclo de detección cuando la etapa se ajusta mediante el primer ajuste y mediante el segundo ajuste.

4. El sistema de la reivindicación 1, en el que el procesador está configurado además para determinar un ajuste de desplazamiento inicial (3010-3015) basado en una posición de una cámara de reacción (1703) asociada con el protocolo (3001-3007).

5. El sistema de la reivindicación 1, en el que el tiempo de ciclo de detección comprende, además, un tiempo requerido para el movimiento del cabezal de detector (700) para cada una de una pluralidad de posiciones de detección de la cámara de reacción y el movimiento del cabezal de detector a la posición inicial.

6. El sistema de la reivindicación 1, en el que el protocolo comprende un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

7. El sistema de la reivindicación 1, en el que el procesador está configurado, además, para iniciar el protocolo.

8. El sistema de la reivindicación 1, en el que el protocolo tiene ciclos, y el primer ajuste es un ajuste en el ciclo para alargar o acortar la duración de una sub-etapa de la etapa de protocolo (5002).

9. El sistema de la reivindicación 1, en el que el protocolo tiene ciclos, y en el que el procesador está configurado además para determinar un ajuste entre ciclos (6005) para alargar o acortar el tiempo entre etapas de protocolo del protocolo.

10. Un método para realizar simultáneamente PCR en tiempo real en una pluralidad de cámaras de reacción de PCR (1703), que comprende:

(a) proporcionar un tiempo de exploración suficiente para un conjunto detector (700) para realizar un ciclo de exploración durante el cual se puede explorar cada una de la pluralidad de cámaras de reacción de PCR para al menos una señal detectable y volverse lista para repetir la exploración;

(b) proporcionar un protocolo de reacción (2000) para cada una de las cámaras de reacción de PCR que incluye múltiples ciclos, comprendiendo cada ciclo un tiempo de ciclo que incluye al menos una etapa de calentamiento (2000A), al menos una etapa de enfriamiento (2000B), y al menos una meseta de temperatura (2000B, 2000D),

que incluye un período de ciclo de lectura durante el cual el conjunto detector explora la cámara de reacción durante al menos una señal detectable;
estando el método caracterizado por que comprende:

(c) determinar, usando un procesador, si el tiempo de ciclo para esa cámara de reacción es el mismo que o un número entero múltiplo del tiempo de exploración, y si no, ajustar el tiempo de ciclo, de manera que el tiempo de ciclo es el mismo que, o un número entero múltiplo del tiempo de exploración;

5 (d) realizar al menos las etapas (b) y (c) para el protocolo de reacción para cada una de la pluralidad de cámaras de reacción de PCR, de modo que el tiempo de ciclo para cada protocolo de reacción es el mismo o un número entero múltiplo del tiempo de exploración; y

10 (e) bajo la dirección de un procesador, realizar PCR en tiempo real en cada una de las cámaras de reacción utilizando el protocolo de reacción para cada una de las cámaras de reacción, incluyendo la realización de múltiples ciclos de exploración con el conjunto de detector, en el que cada cámara de reacción de PCR es explorada por el conjunto de detector durante cada período de ciclo de lectura para esa cámara de reacción.

11. El método de la reivindicación 10, que comprende además ajustar la fase del tiempo de ciclo del protocolo de reacción para al menos una de las cámaras de reacción (1703).

15 12. El método de la reivindicación 10, en el que al menos uno de dichos protocolos de reacción es diferente de otro de dichos protocolo de reacción.

13. El método de la reivindicación 12, en el que al menos un tiempo de ciclo en un protocolo de reacción es diferente del tiempo de ciclo en otro protocolo de reacción.

20

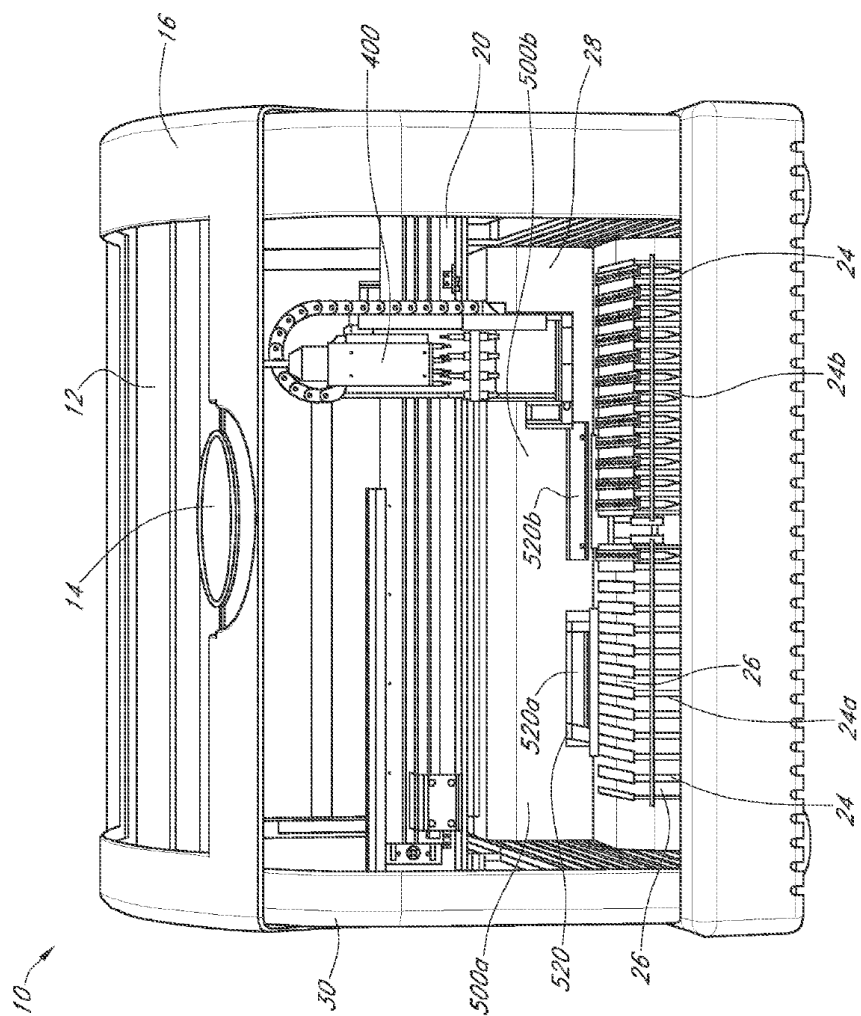


FIG. 1A

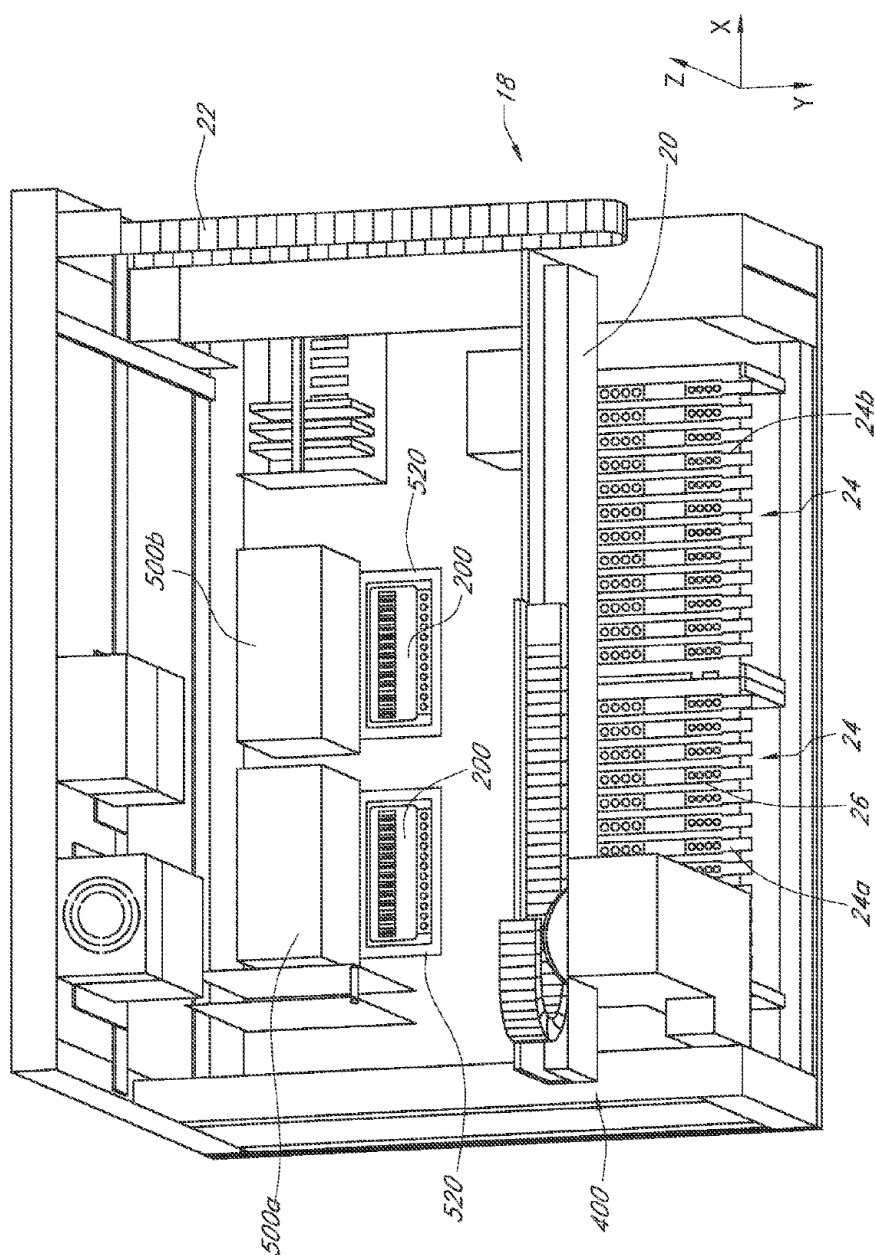


FIG. 1B

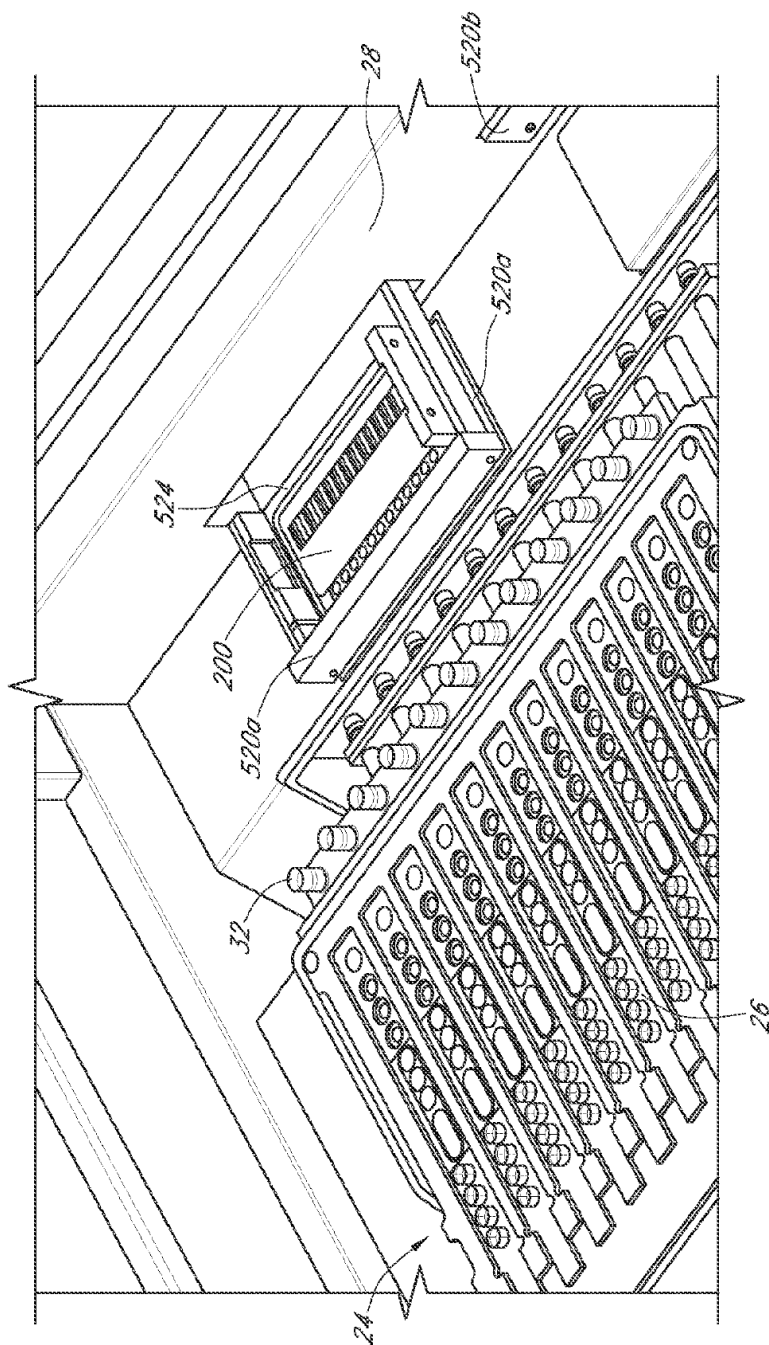
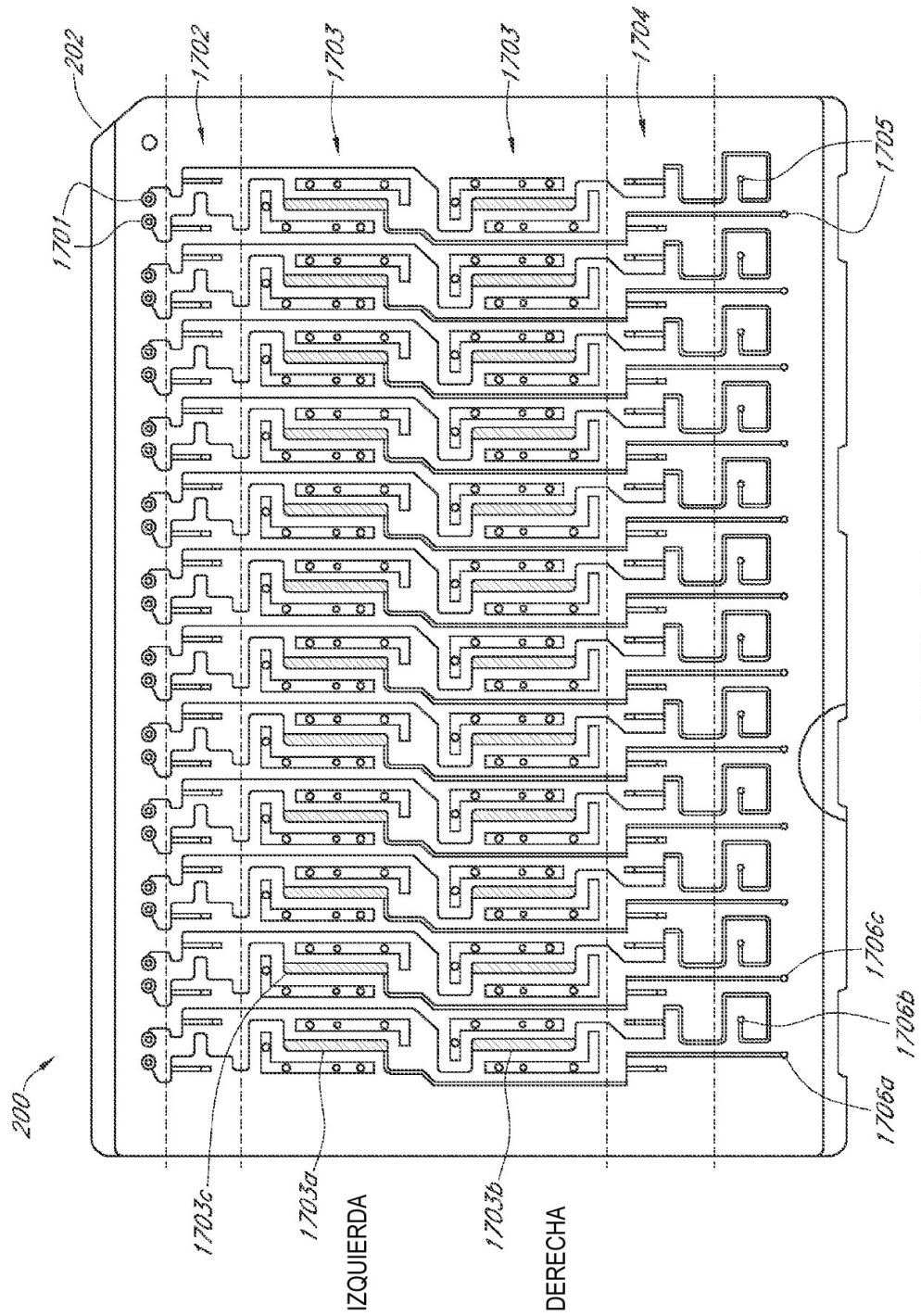


FIG. 2



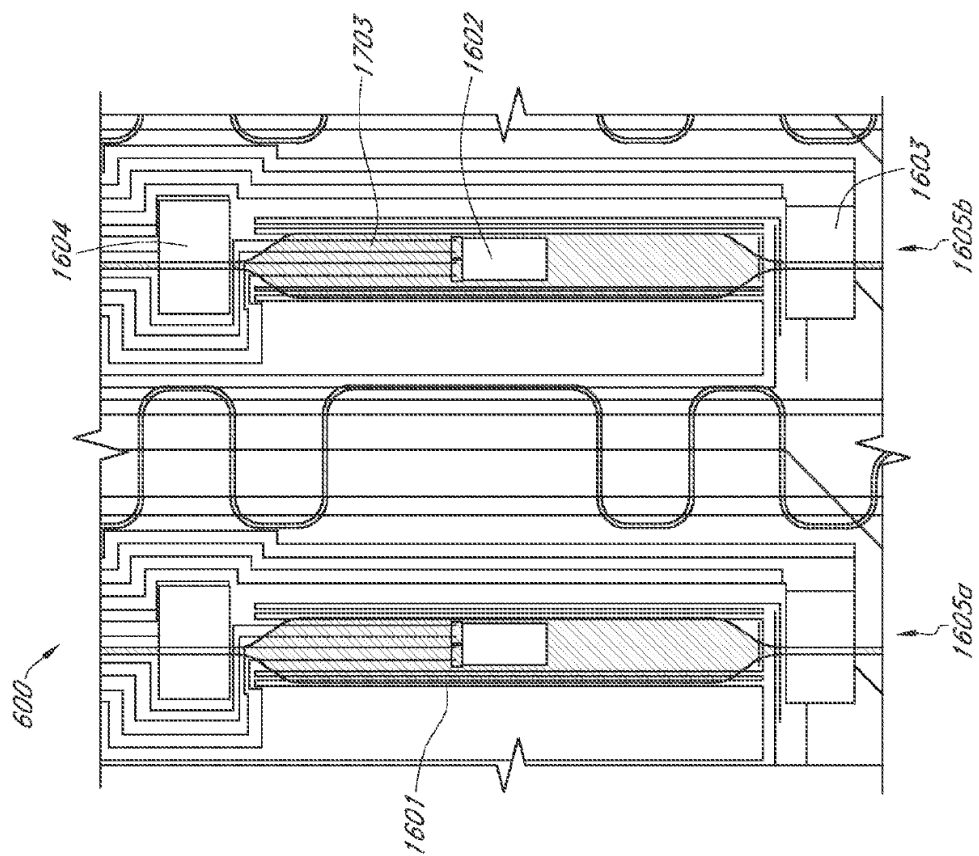
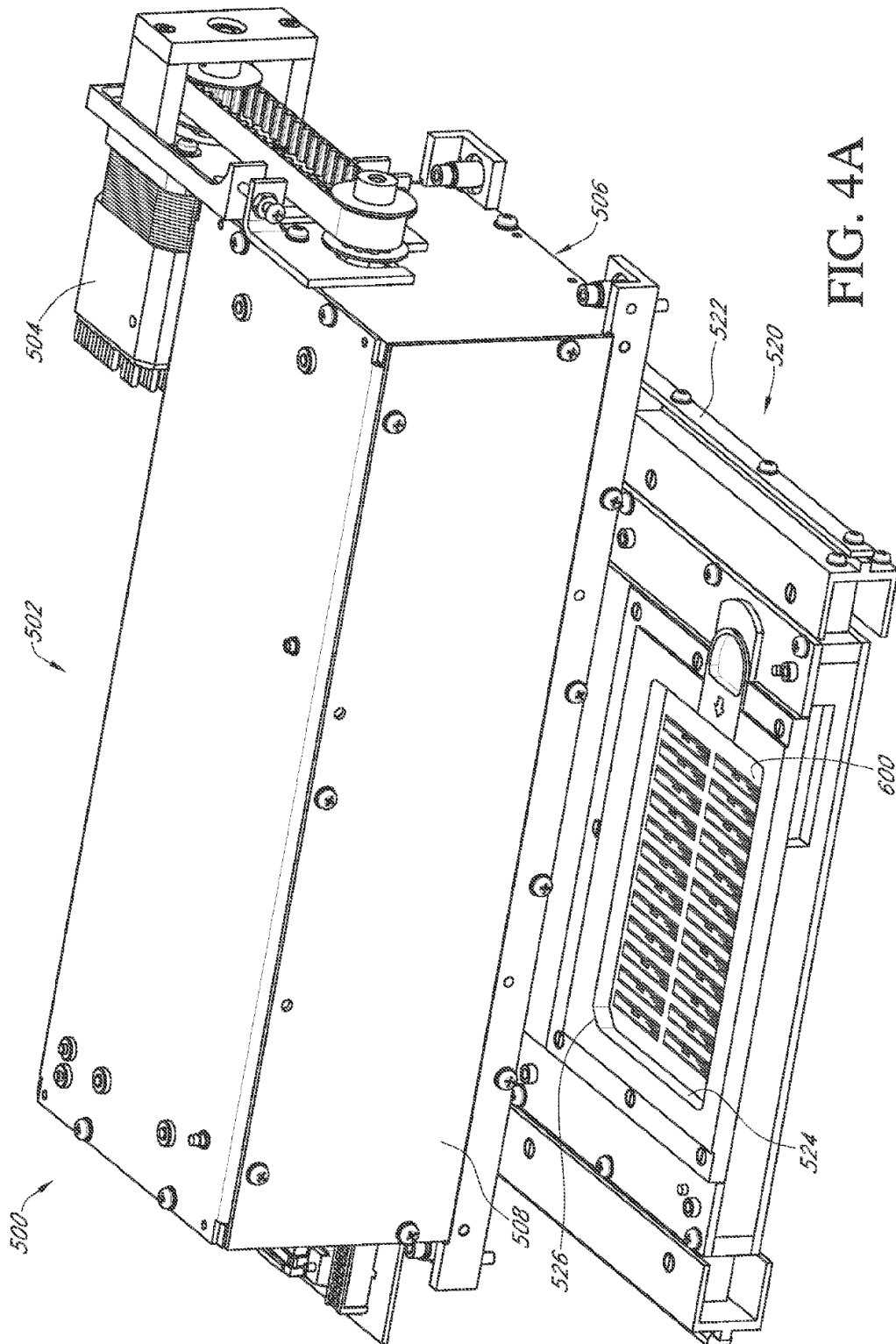


FIG. 3B



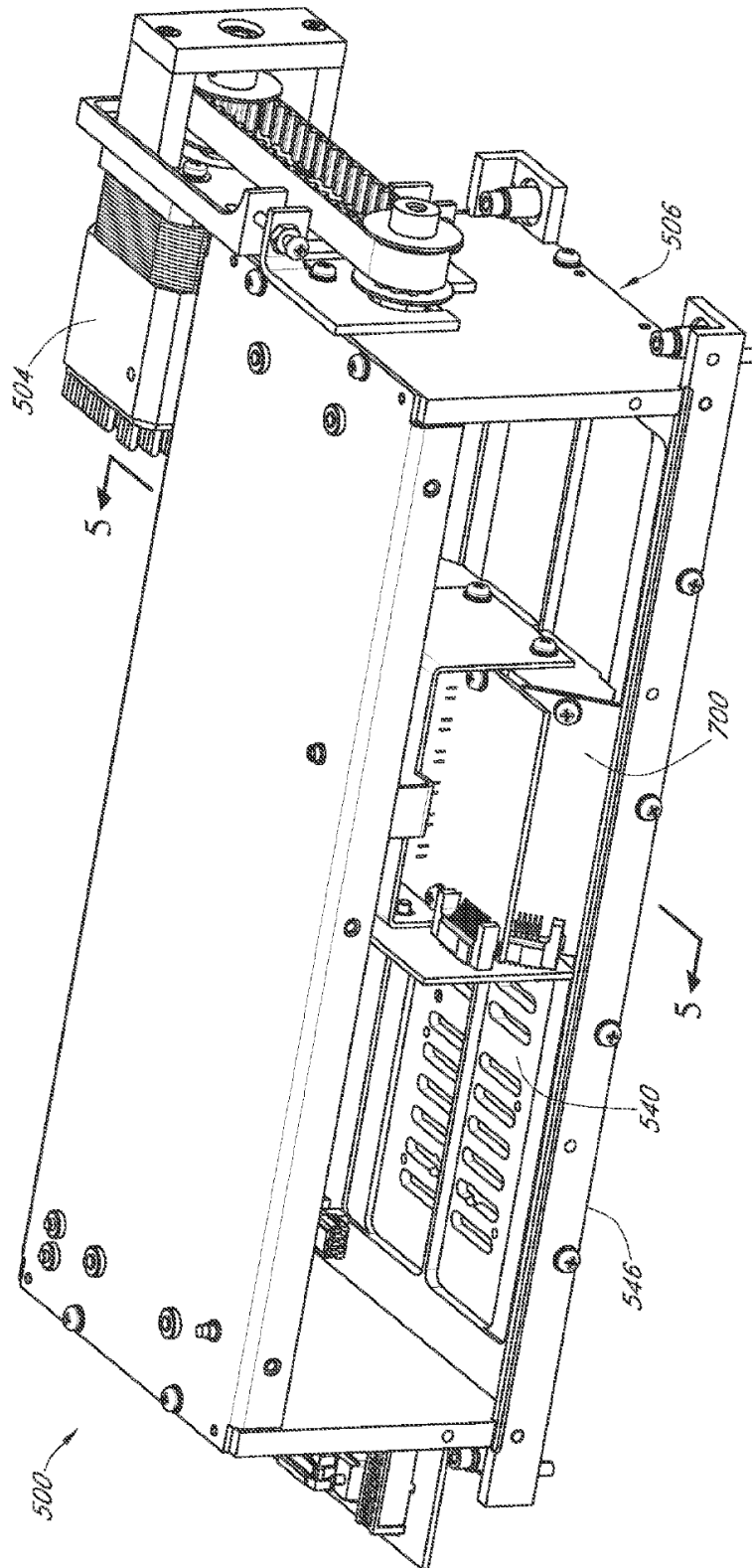


FIG. 4B

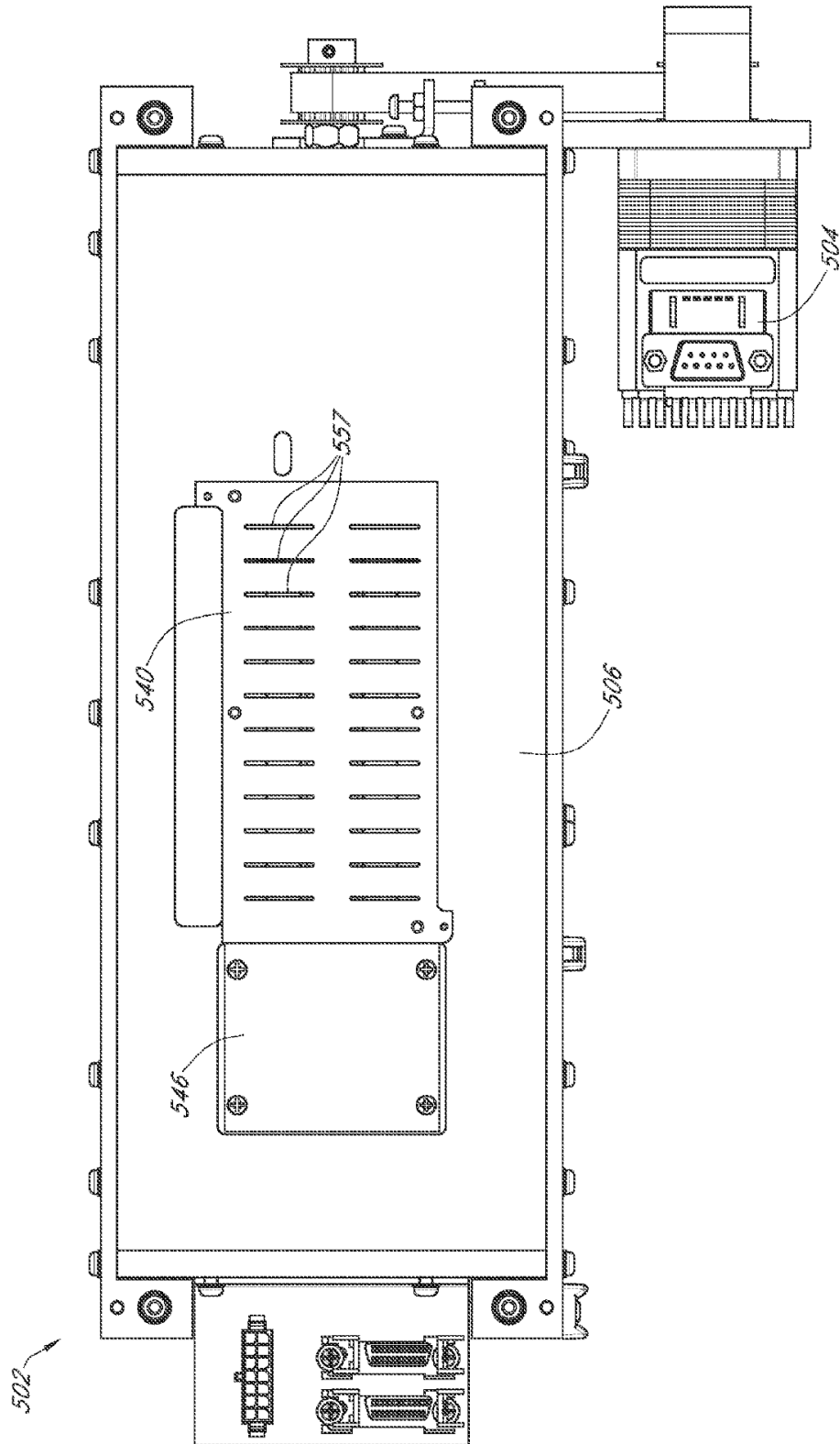


FIG. 4C

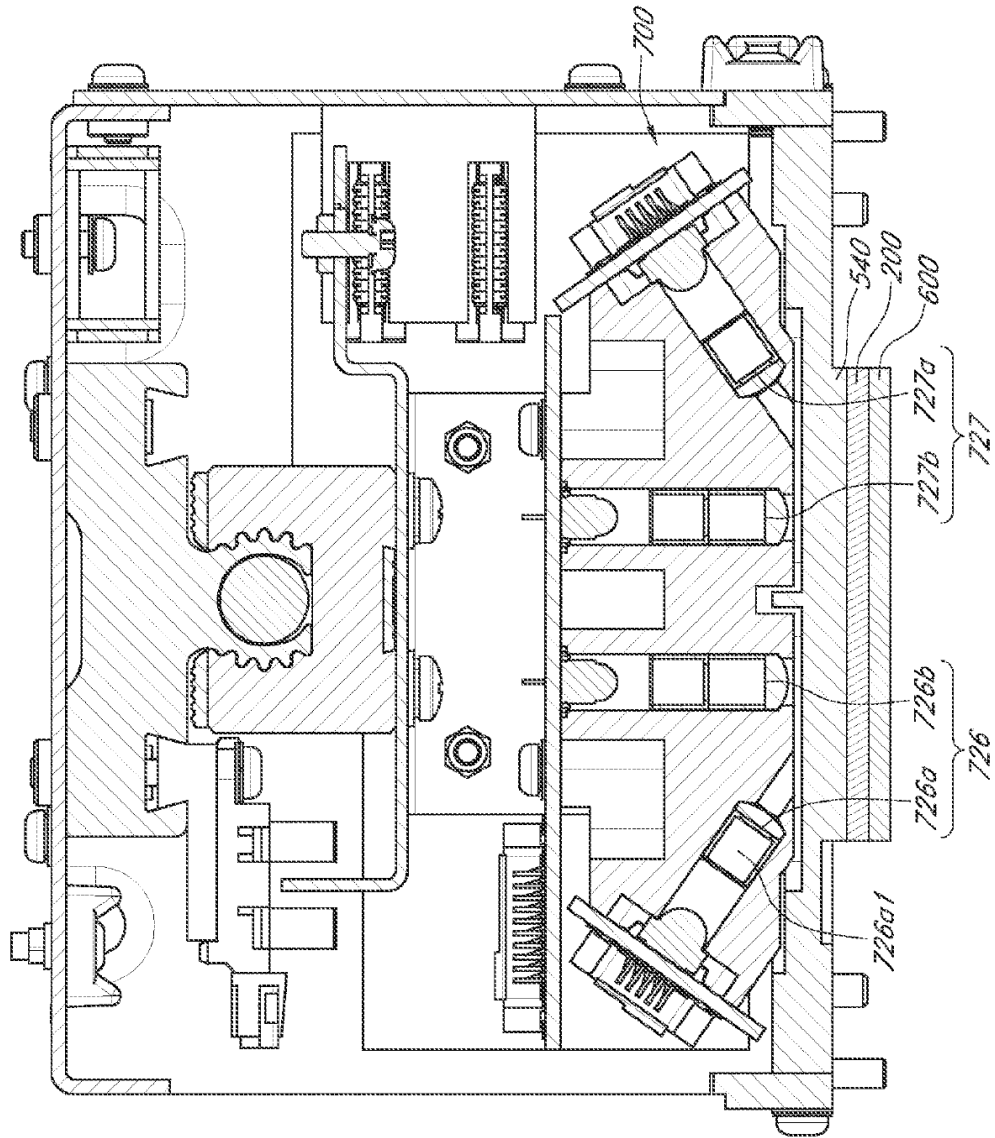


FIG. 5

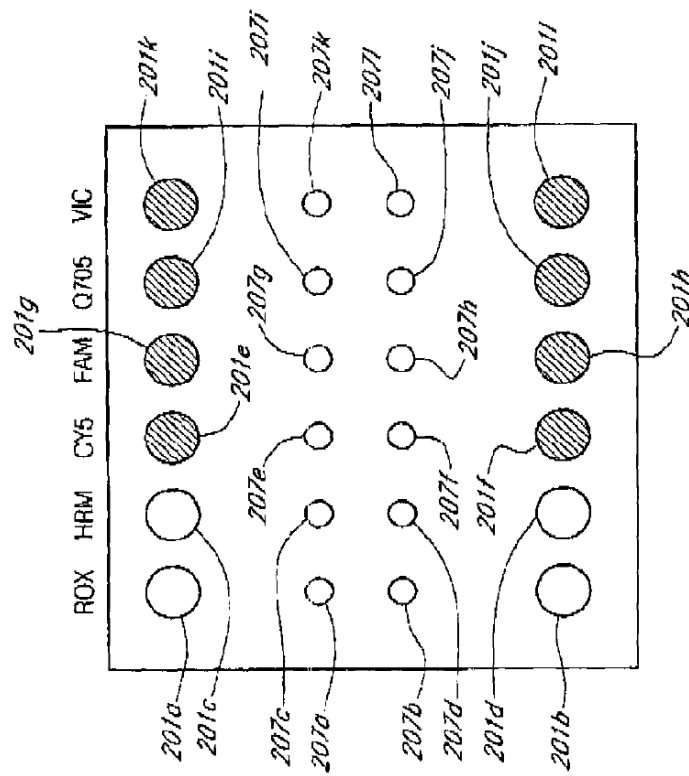


FIG. 6

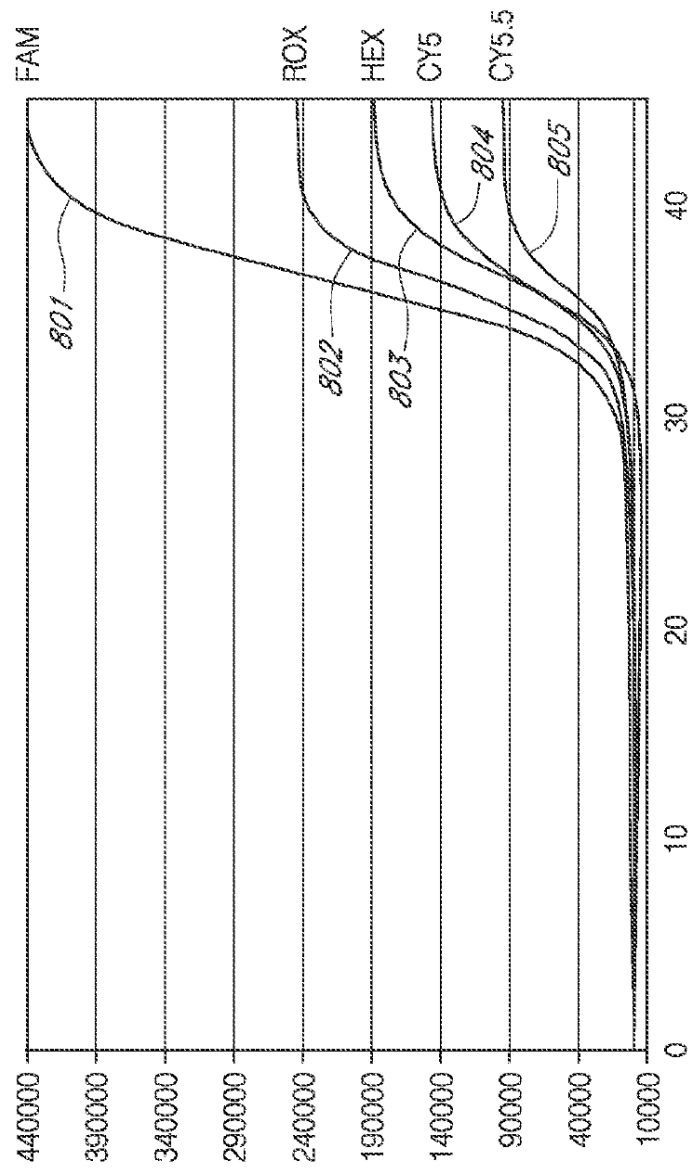


FIG. 7

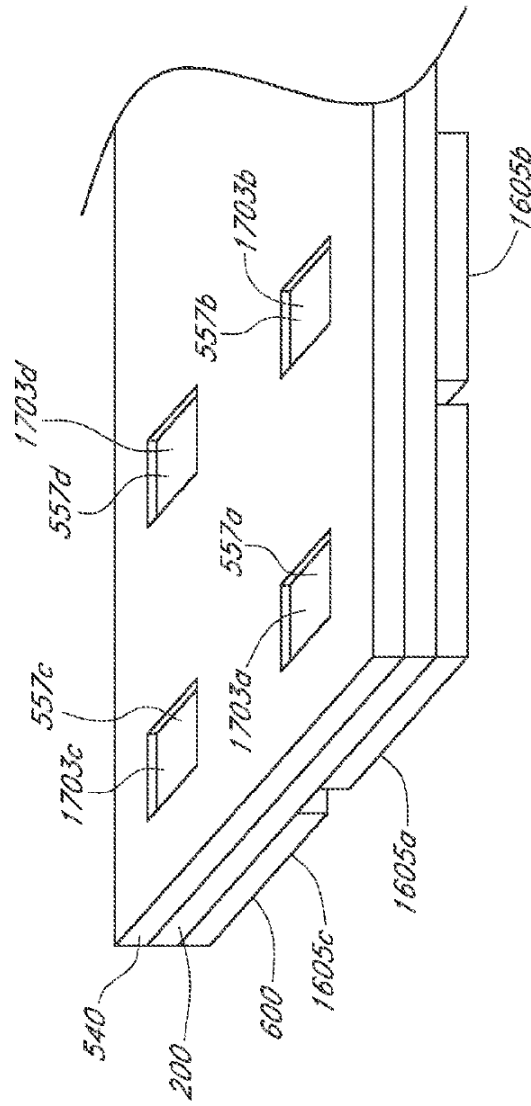


FIG. 8

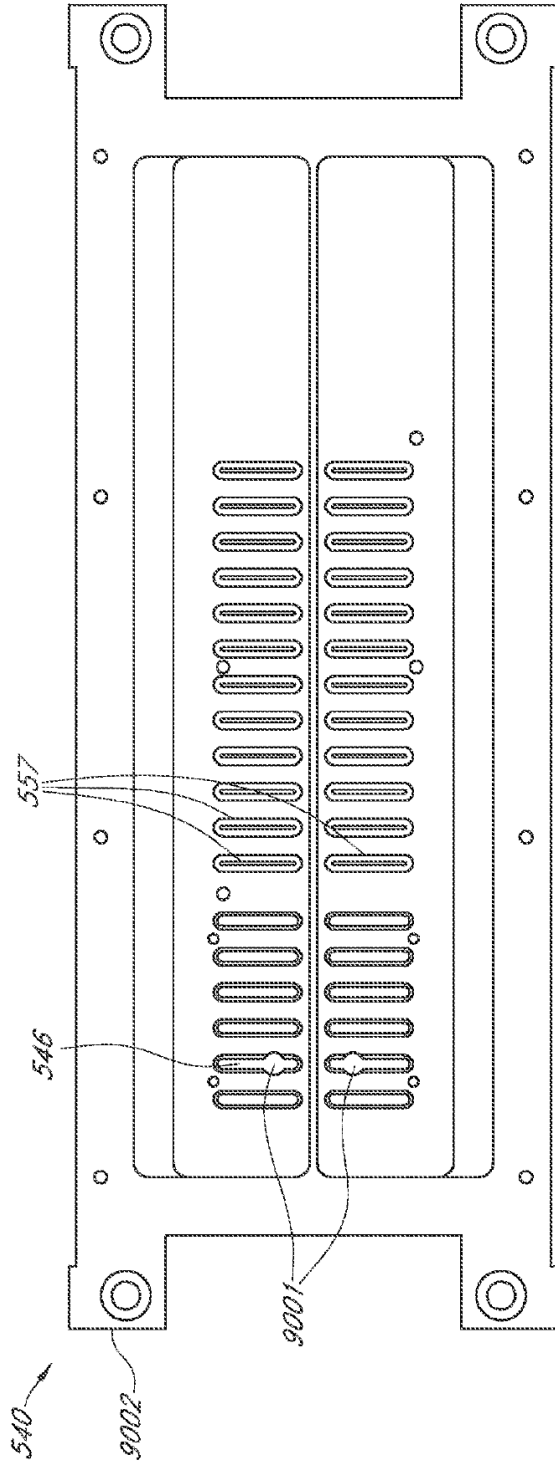


FIG. 9A

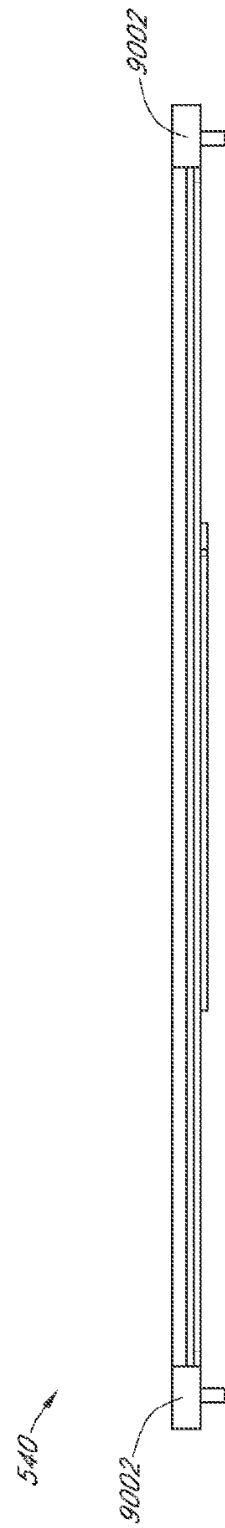


FIG. 9B

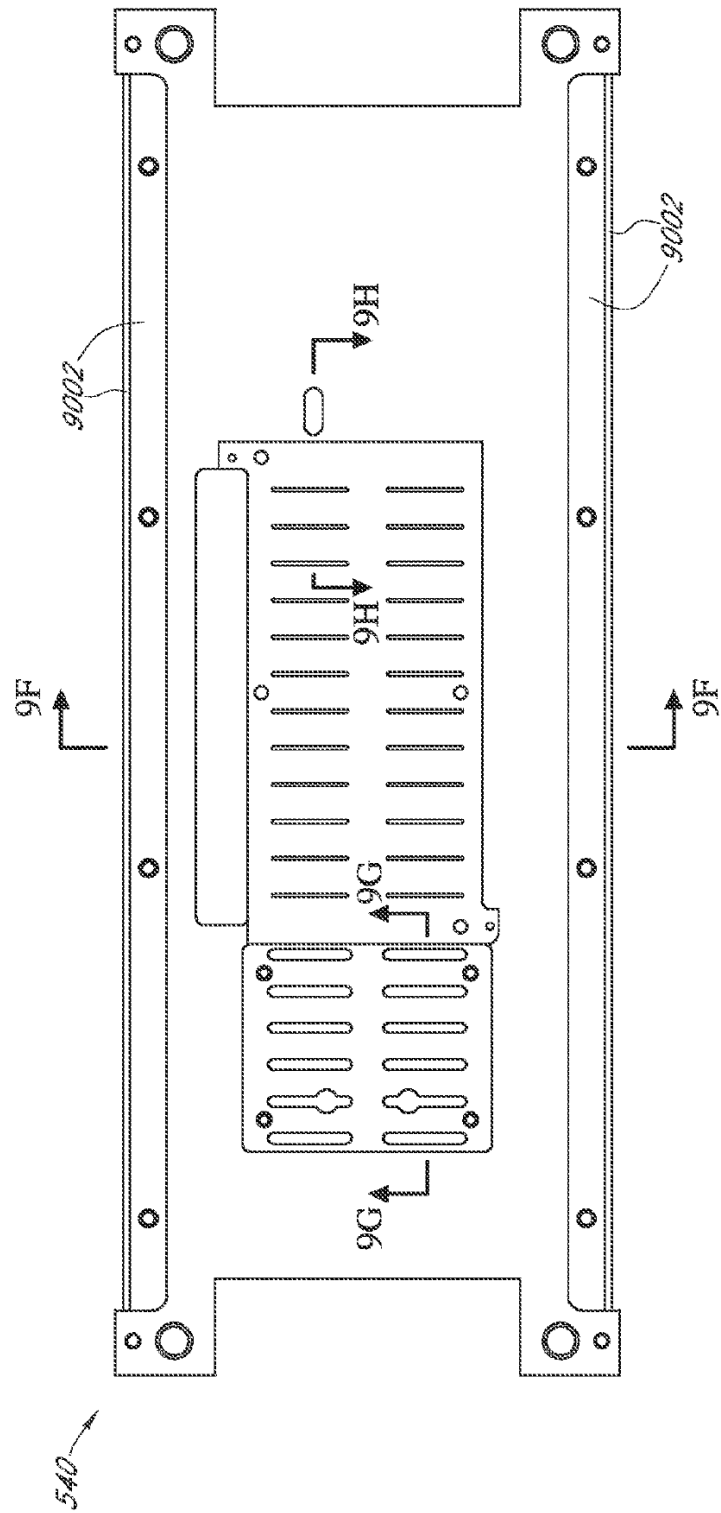


FIG. 9C

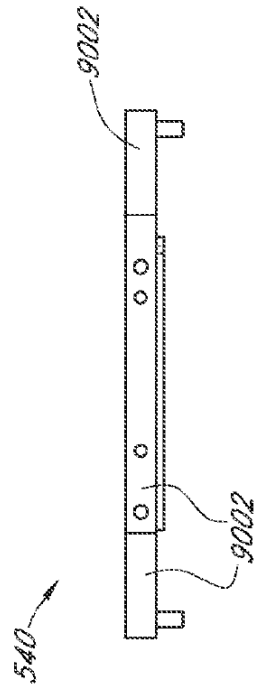


FIG. 9E

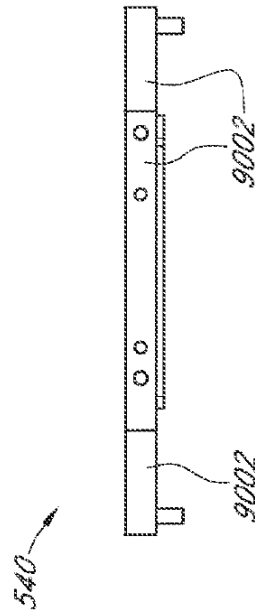


FIG. 9D

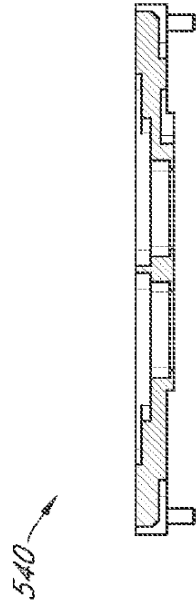


FIG. 9F

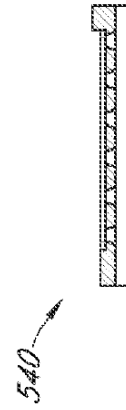


FIG. 9G

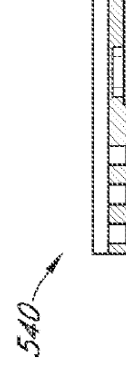


FIG. 9H

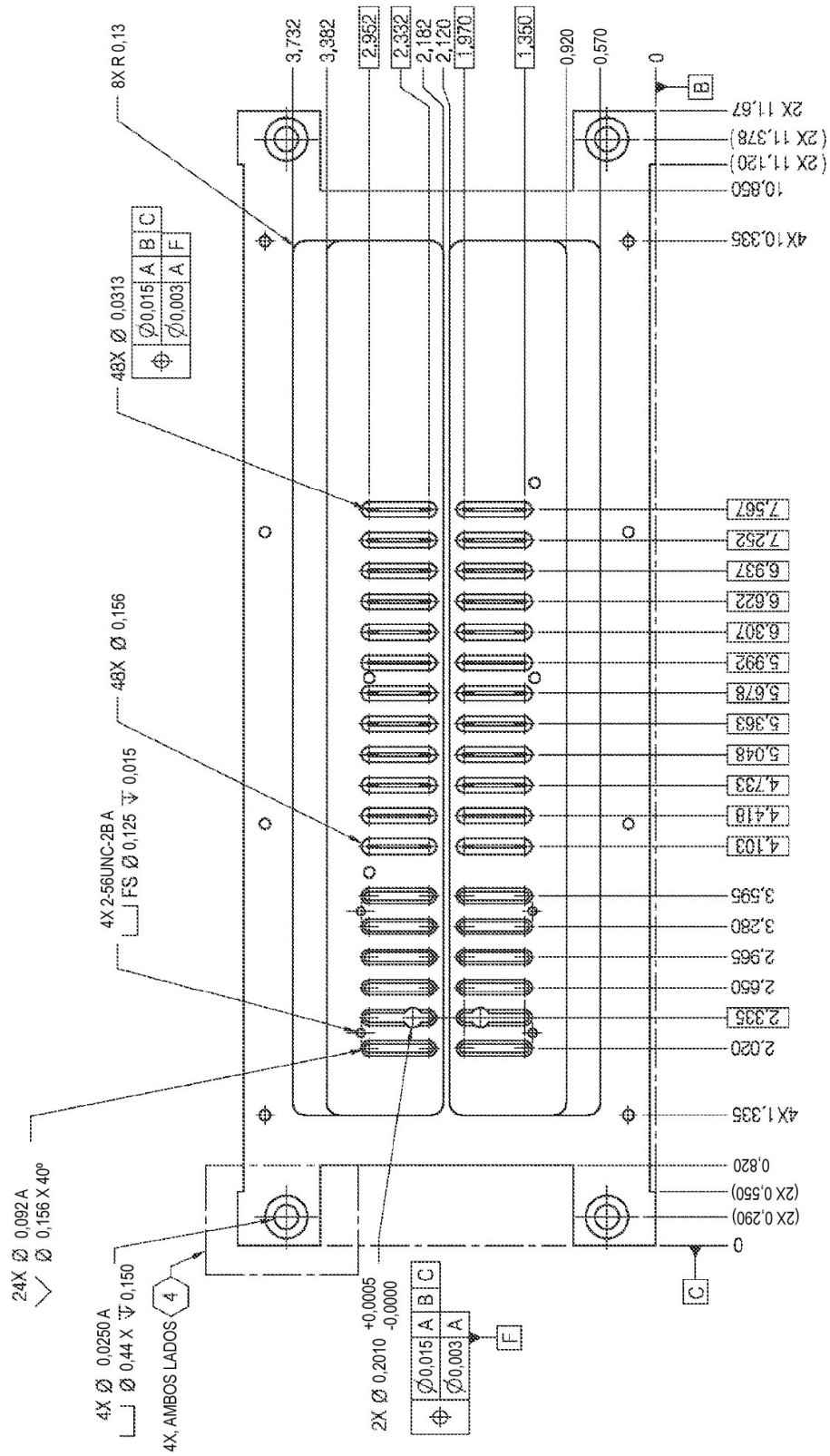


FIG. 10A

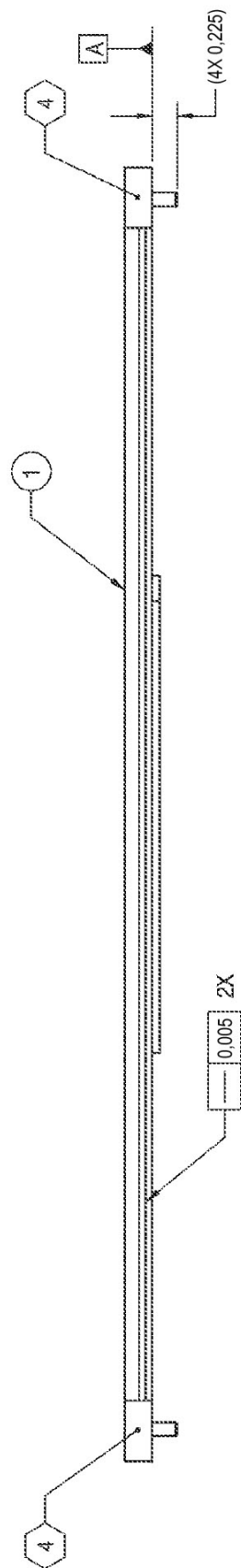


FIG. 10B

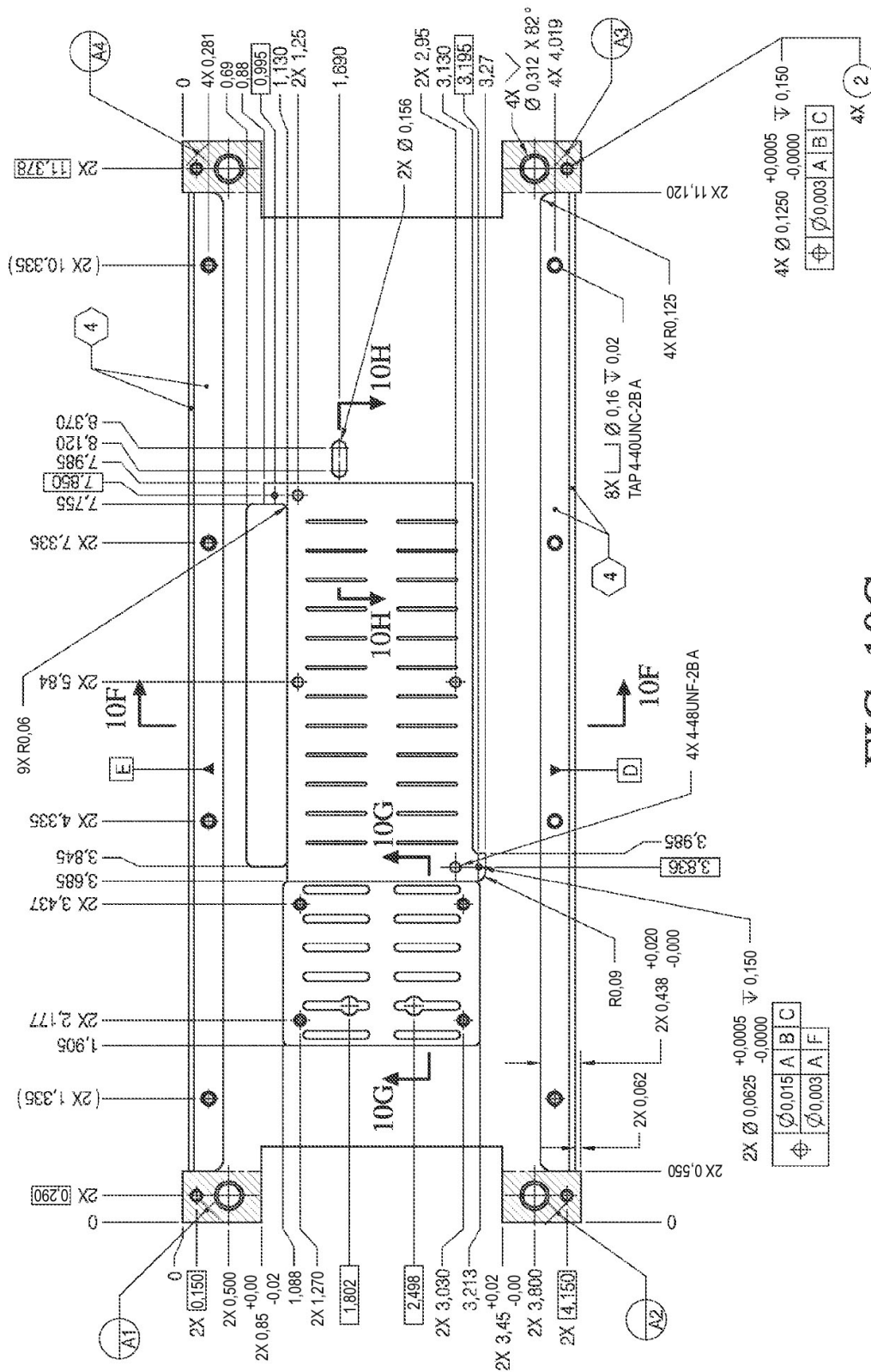


FIG. 10C

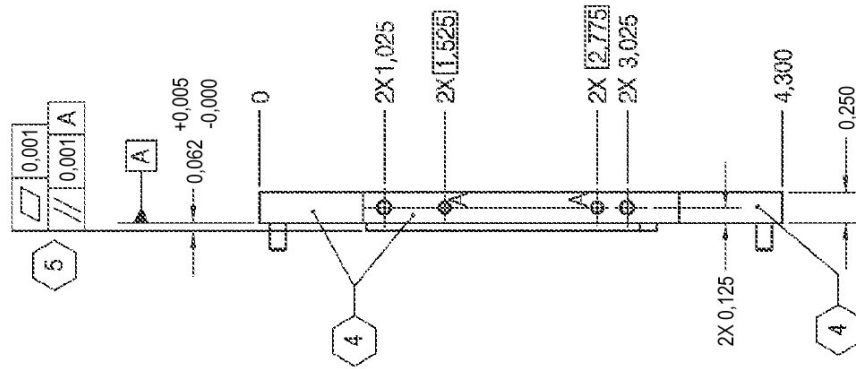


FIG. 10E

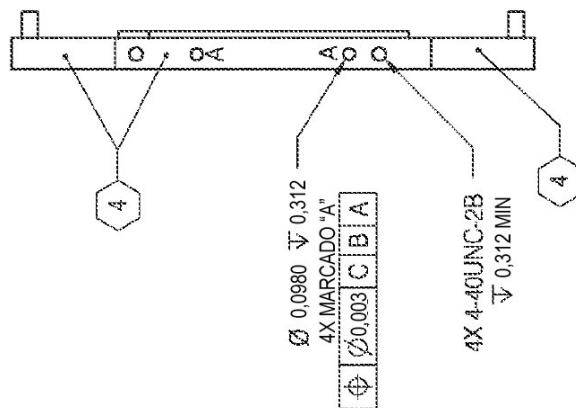
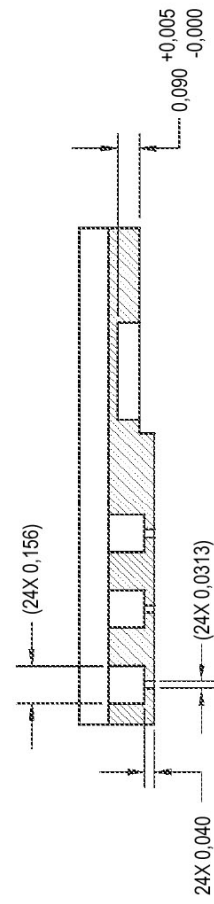
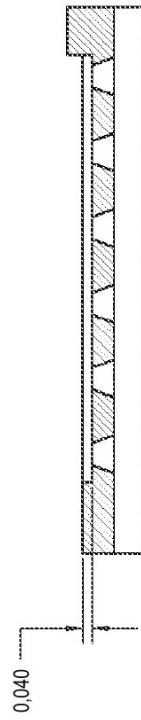
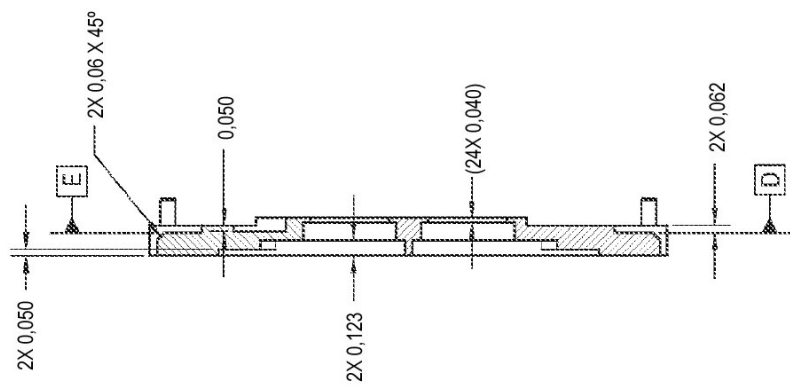


FIG. 10D



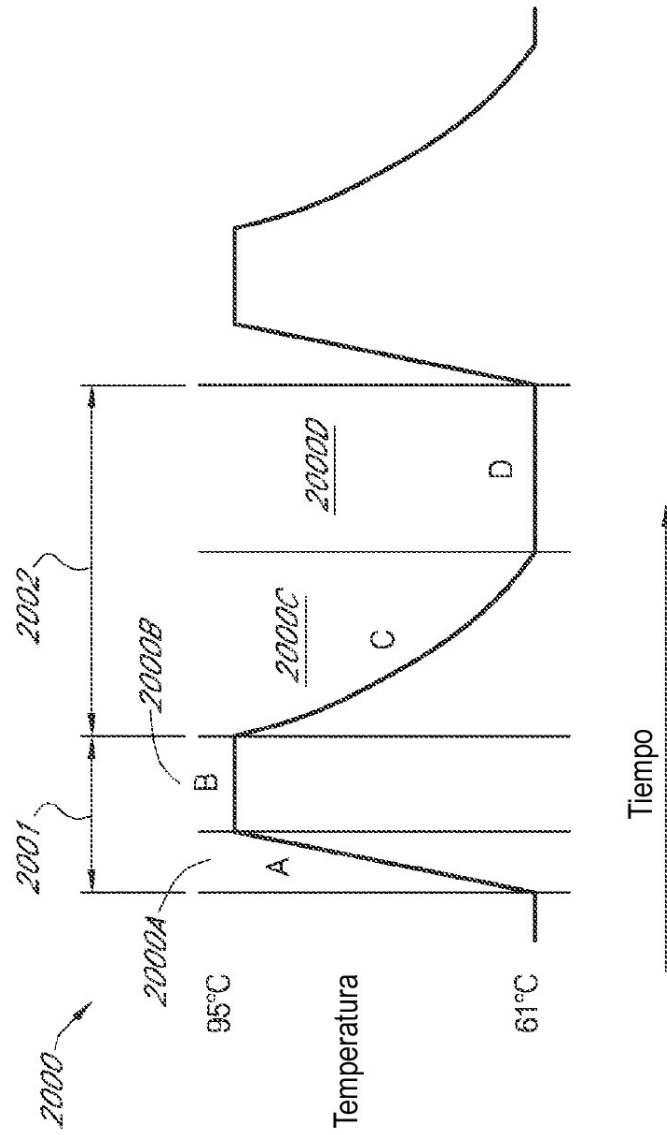


FIG. 11

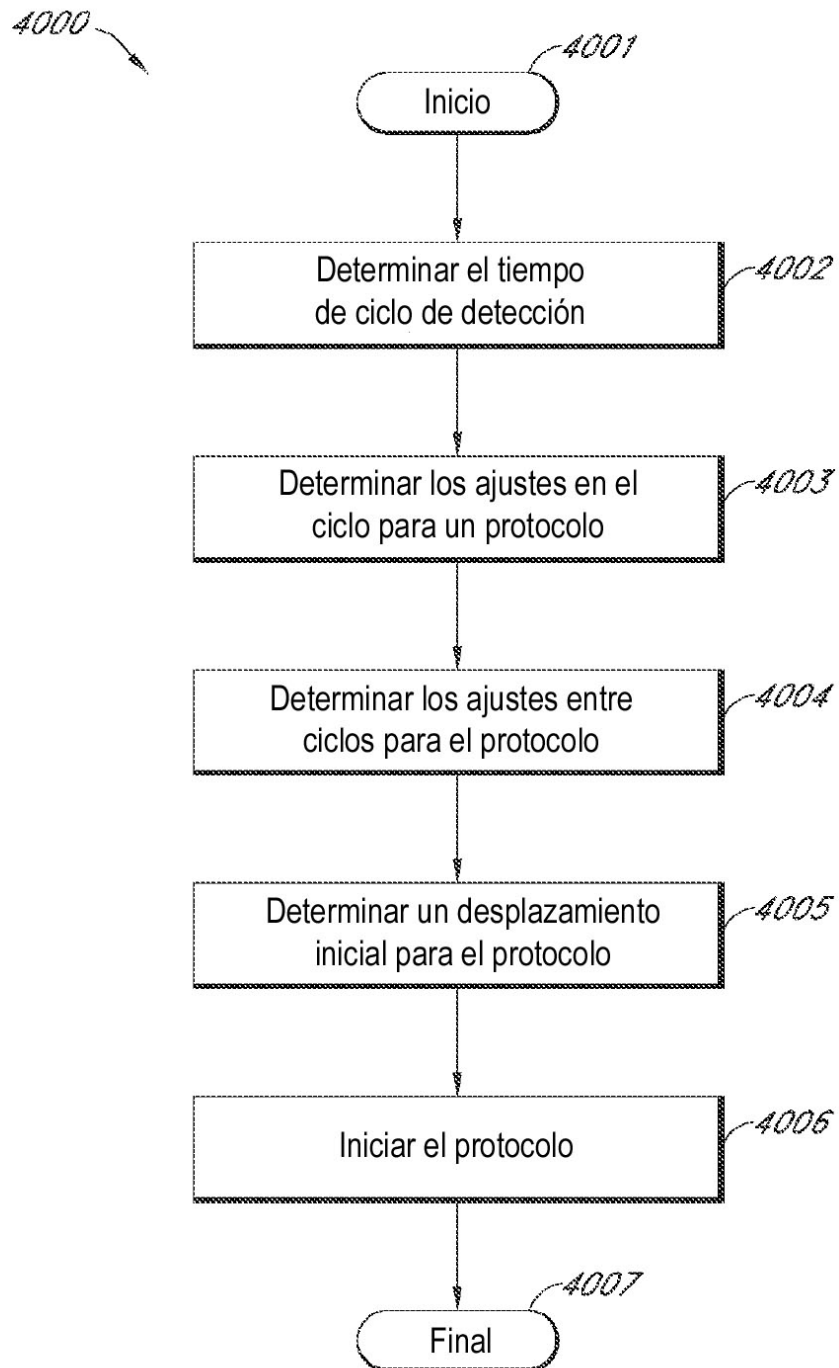


FIG. 12

Figure 13 illustrates a testing interface 5000, divided into two main sections: "Detalles prueba" (Test Details) and a results/confirmation area.

The "Detalles prueba" section is further divided into two sub-sections:

- Incubar (Incubate):**
 - Ciclos (Cycles):** 1
 - Tipo perfil (Profile type):** Mantenimiento
 - Table:**

Tipo	Tiempo(s)	Temp (C)	Detectar
	900,0	95,0	☐
- PCR:**
 - Ciclos (Cycles):** 45
 - Tipo perfil (Profile type):** 2 - Temperatura
 - Table:**

Tipo	Tiempo(s)	Temp (C)	Detectar
	2,0	95,0	☐
	10,2	61,0	☒

The results/confirmation area at the bottom contains two radio buttons:

- ☐ Esta etapa es válida.
- ☐ Esta etapa no es válida. Debe añadir 4,3 segundos o eliminar 5.7 segundos.

FIG. 13

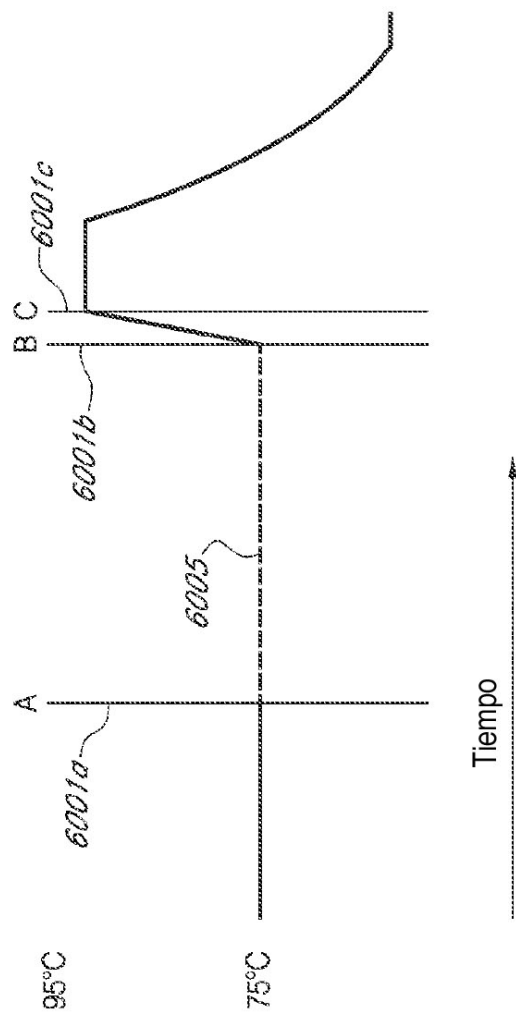


FIG. 14

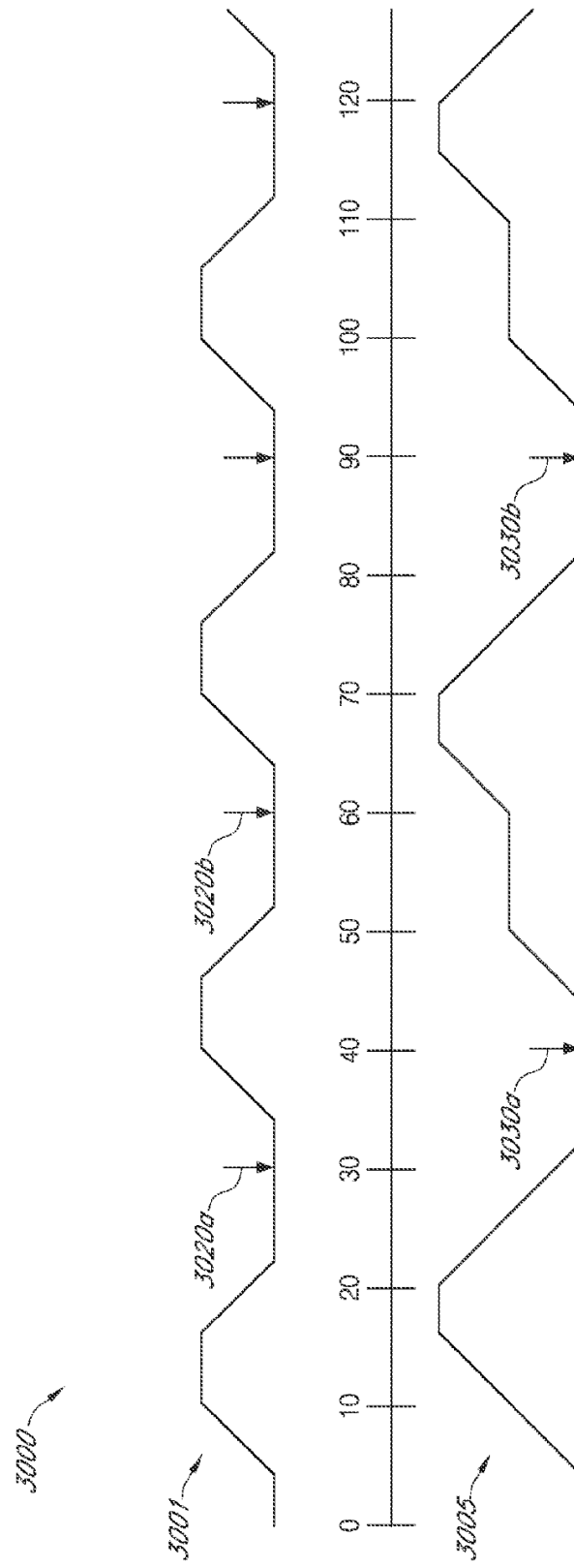


FIG. 15A

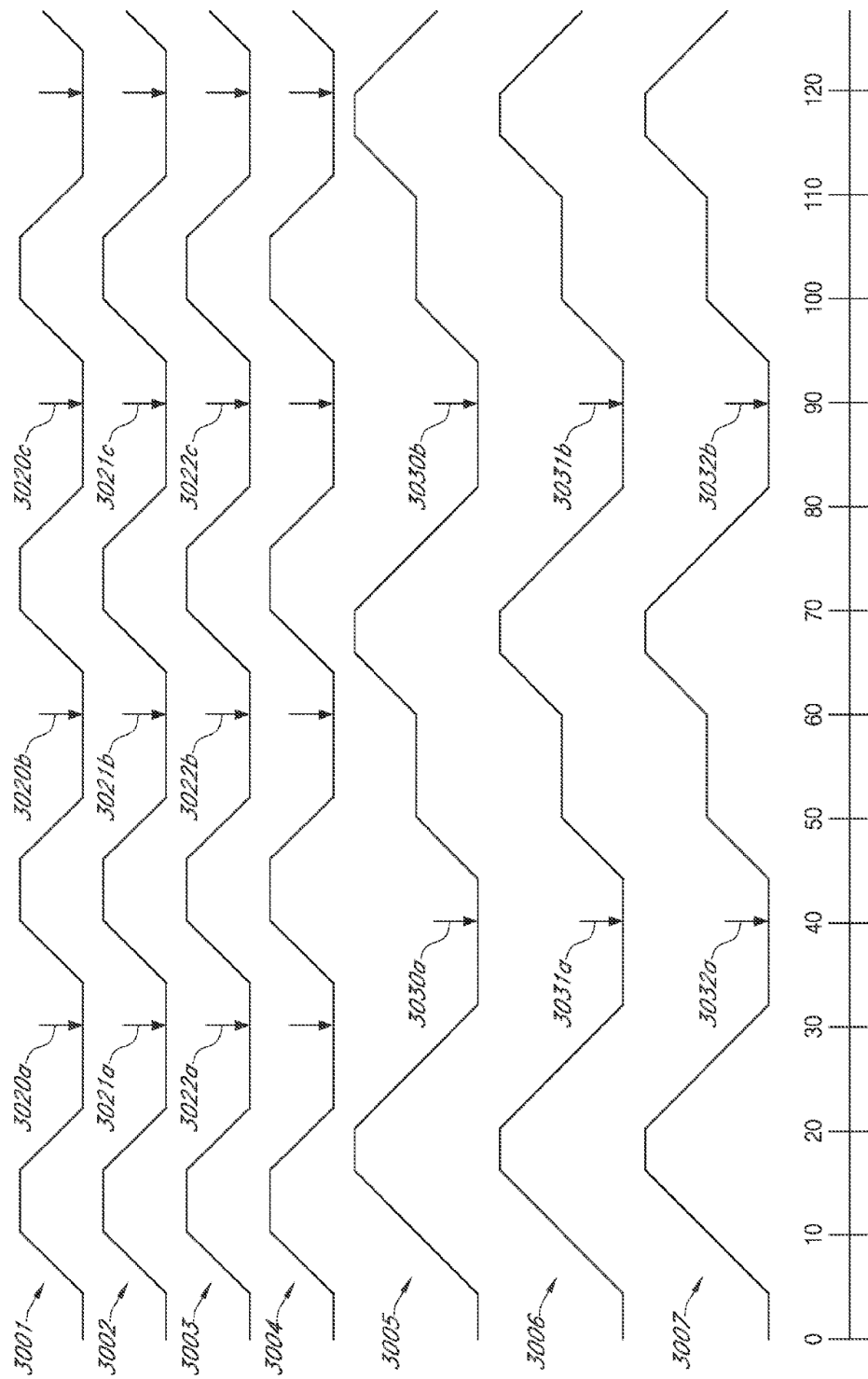
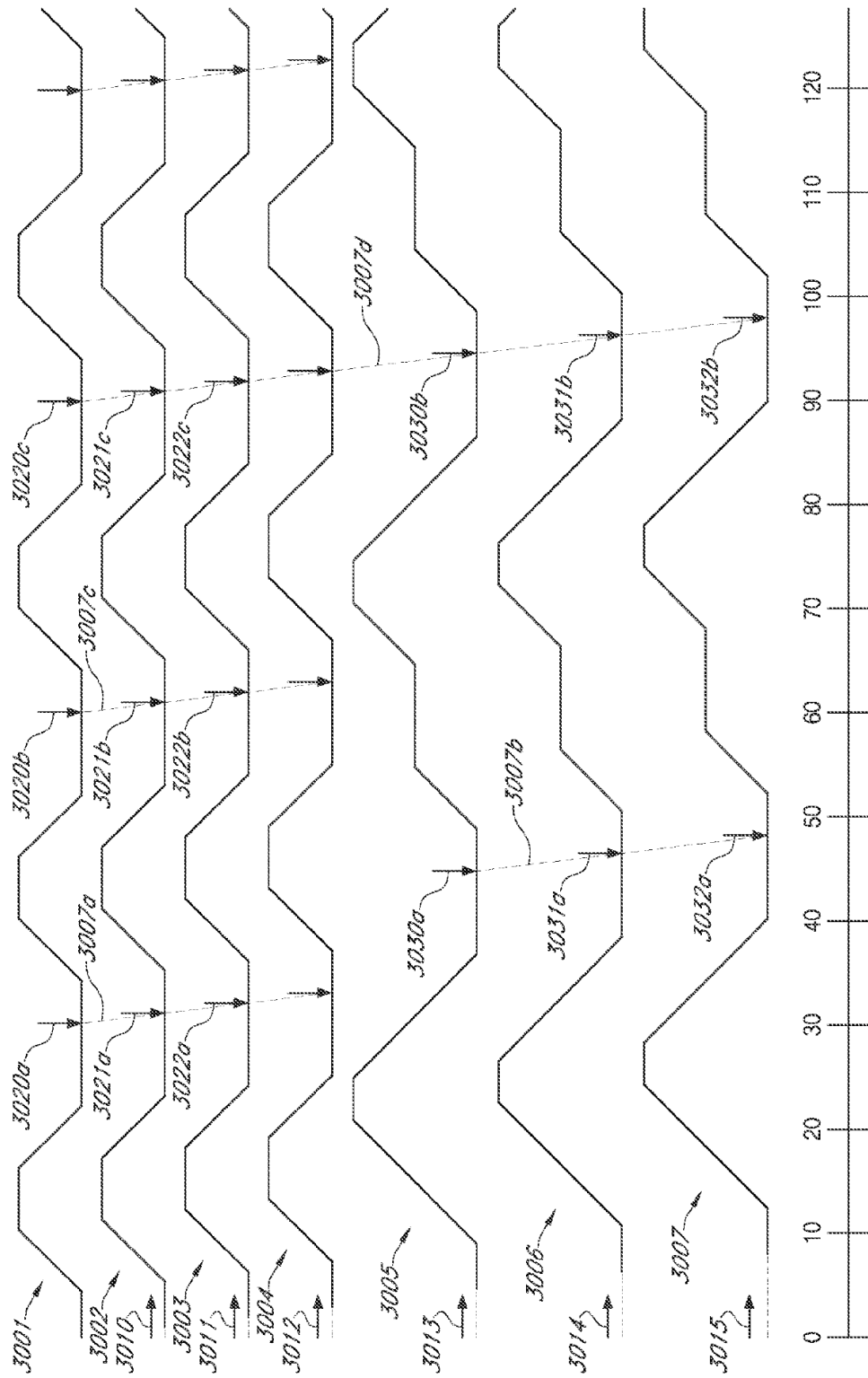


FIG. 15B



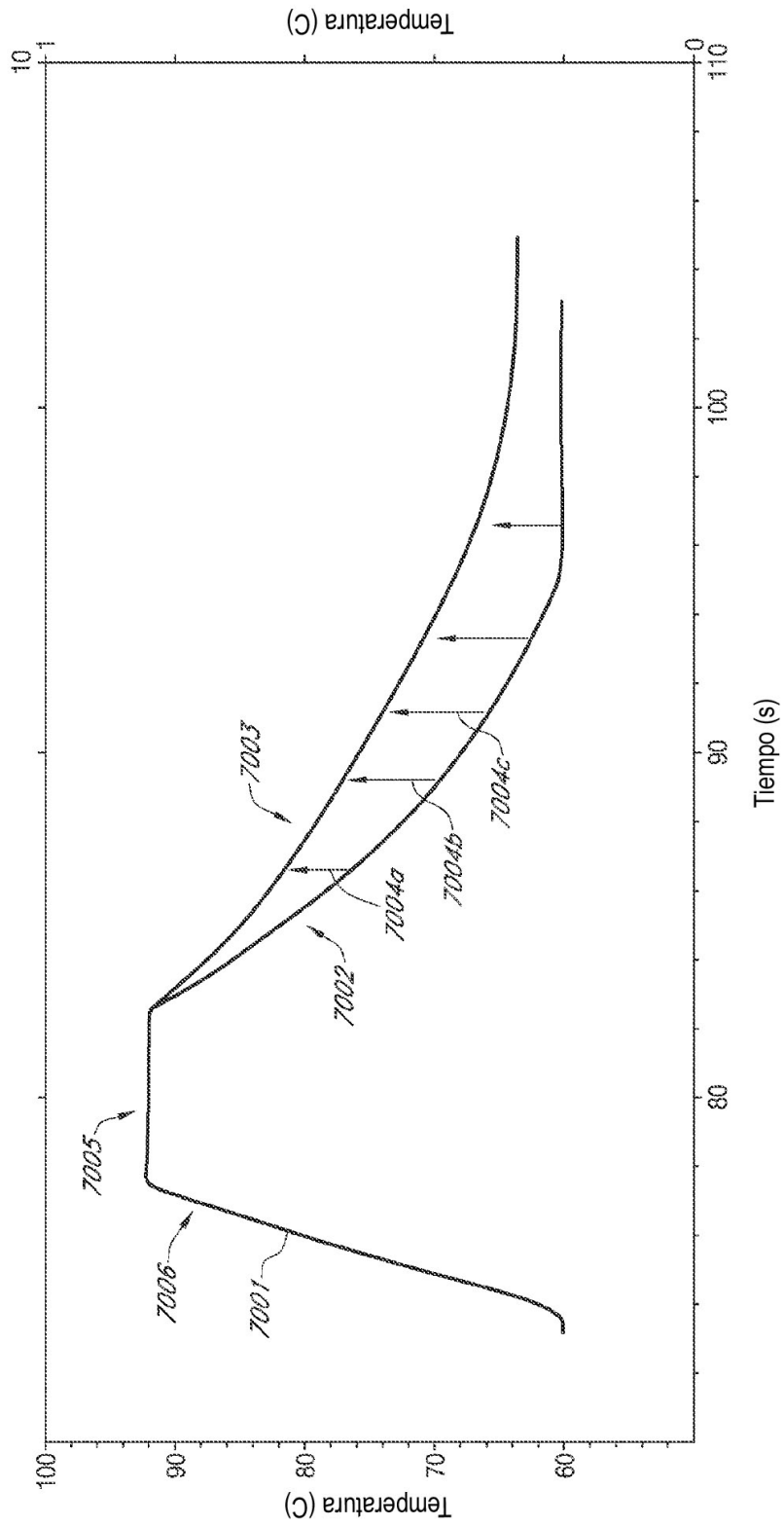


FIG. 16