

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 028**

51 Int. Cl.:

G01N 35/02	(2006.01)
G01N 35/00	(2006.01)
G01N 21/27	(2006.01)
G01N 21/64	(2006.01)
B01L 9/00	(2006.01)
B01L 7/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012** E 16199078 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** EP 3159697

54 Título: **Termociclador microfluídico de barrido en tiempo real**

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:
24.06.2020

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:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 769 028 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 barrido en tiempo real

5 **Campo técnico**

Los sistemas y los procedimientos divulgados en la presente memoria se refieren, en general, a la ejecución automatizada de ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y, en algunos casos, la PCR en tiempo real, en una pluralidad de cámaras de reacción microfluídicas en un cartucho microfluídico. El sistema puede detectar posteriormente ácidos nucleicos objetivos, por ejemplo, amplicones objetivos, dentro de cada una de las cámaras de reacción.

Antecedentes de la invención

15 La industria del diagnóstico médico es un elemento crítico de la infraestructura médica actual. En la actualidad, sin embargo, los análisis de diagnóstico *in vitro*, independientemente de lo rutinario sean, se han convertido en un cuello de botella en la atención al paciente. Hay varias razones para ello. Primero, muchos análisis de diagnóstico solo pueden realizarse con equipos altamente especializados que son caros y pueden ser manipulados solamente por médicos capacitados. Tal equipamiento puede encontrarse en solo unos pocos lugares, frecuentemente solo uno en cualquier

20 área urbana. Esto requiere que los hospitales envíen muestras para análisis a estos lugares, incurriendo de este modo en costos de envío y demoras en el transporte, y posiblemente incluso en la pérdida o el mal manejo de la muestra. Segundo, el equipamiento en cuestión generalmente no está disponible "a pedido", sino que se ejecuta en lotes, retrasando de este modo el tiempo de procesamiento de muchas muestras, ya que deben esperar a que una máquina alcance la capacidad antes de que puedan ejecutarse.

25 Teniendo en cuenta que los ensayos de diagnóstico en muestras biológicas pueden dividirse en varias etapas claves, frecuentemente es conveniente automatizar una o más etapas. Por ejemplo, muestras biológicas, tales como las obtenidas de un paciente, pueden usarse en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, para amplificar un ácido nucleico objetivo de interés (por ejemplo, ADN, ARN o similares). Una vez amplificados, puede detectarse la presencia de un ácido nucleico objetivo, o el producto de amplificación de un reactor de ácido nucleico objetivo (por ejemplo, un amplicón objetivo), en el que la presencia de un ácido nucleico objetivo y/o un amplicón objetivo se usa para identificar y/o cuantificar la presencia de un objetivo (por ejemplo, un microorganismo objetivo o similar). Frecuentemente, los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos implican múltiples etapas, que pueden incluir extracción de ácidos nucleicos, amplificación y detección de ácidos nucleicos. Es conveniente automatizar ciertas etapas de estos procesos.

30 El documento US 2009/130745 divulga un aparato para realizar la amplificación y la detección de ácidos nucleicos en tiempo real, que comprende un módulo óptico que comprende un cabezal detector, una placa de aberturas y una bandeja receptora para recibir un cartucho microfluídico.

40 Existe la necesidad de un procedimiento y un aparato para llevar a cabo ensayos de diagnóstico molecular en muestras múltiples en paralelo, con o sin amplificación de ácidos nucleicos objetivos, y la detección en muestras biológicas preparadas. El sistema puede configurarse para un rendimiento alto y operación en un laboratorio de referencia comercial o en el punto de atención, eliminando de este modo la necesidad de enviar la muestra a una instalación especializada.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un aparato (10) para realizar la amplificación y la detección de ácidos nucleicos en tiempo real, que comprende:

un módulo óptico (502) que comprende:

50 un cabezal detector (700) montado en un riel alojado en el módulo óptico,
 el cabezal detector que comprende una pluralidad de pares de detectores (726), donde cada par de detectores tiene al menos una fuente de luz (726a) y al menos un detector de luz (726b);
 una placa de aberturas (540) dispuesta en un lado inferior del módulo óptico,
 la placa de aberturas comprende una pluralidad de aberturas (557), en la que la cabeza del detector puede moverse

55 a lo largo del riel para colocar las fuentes de luz sobre las aberturas de la placa de aberturas; y
 una placa normalizadora (546) configurada para calibrar los pares de detectores en el cabezal detector, la placa normalizadora que comprende uno o más componentes que tienen características ópticas estandarizadas conocidas, en la que la placa normalizadora está unida a un lado inferior de la placa de aberturas debajo de al menos una porción de la pluralidad de las aberturas;

60 en el que el aparato comprende además una bandeja receptora (520) unida al módulo óptico para recibir un cartucho microfluídico (200), el cartucho microfluídico que comprende una pluralidad de cámaras de reacción independientes, en el que la bandeja receptora coloca el cartucho microfluídico debajo del módulo óptico, tal que cada una de la pluralidad de las cámaras de reacción está alineada con una abertura de la placa de aberturas.

65 En la presente memoria se divulgan además los procedimientos y dispositivos para el análisis simultáneo de múltiples muestras. Ciertas realizaciones contemplan un aparato para realizar la amplificación y la detección de ácidos nucleicos

5 en tiempo real. El aparato incluye un cabezal detector que comprende una pluralidad de pares de fotodetectores y fuentes de luz. El cabezal detector está montado en un riel, en el que los pares del detector y la fuente de luz están alineados en una primera fila y una segunda fila. El aparato incluye un receptáculo para un cartucho microfluídico que tiene una pluralidad de cámaras de reacción independientes alineadas en columnas adyacentes de una primera fila y una segunda fila. El aparato incluye además una placa de aberturas que se configura para colocarse sobre el cartucho microfluídico cuando el cartucho está presente en el receptáculo. La placa de aberturas incluye una pluralidad de aberturas que están alineadas cada una sobre la pluralidad de cámaras de reacción cuando el receptáculo está sosteniendo el cartucho microfluídico. El cabezal detector puede ubicarse sobre la placa de aberturas, y puede moverse a lo largo del riel, de modo que cada una de la pluralidad de pares de fotodetectores y fuentes de luz en la primera fila se colocan sobre cada abertura en la primera fila de la placa de aberturas, y cada una de la pluralidad de pares de fotodetectores y fuentes de luz en la segunda fila se colocan sobre cada abertura en la segunda fila de la placa de aberturas.

15 En algunas realizaciones, el aparato incluye además un segundo cabezal detector que tiene una pluralidad de pares de fotodetectores y fuentes de luz alineados en una primera fila y una segunda fila. El segundo cabezal detector del detector puede montarse en el riel. El aparato puede incluir además un segundo receptáculo para un cartucho microfluídico que incluye una pluralidad de cámaras de reacción independientes alineadas en columnas adyacentes de una primera fila y una segunda fila. El aparato puede incluir además una segunda placa de aberturas configurada para colocarse sobre el segundo cartucho microfluídico cuando el segundo cartucho está presente en el segundo receptáculo, y que puede incluir una pluralidad de aberturas que están alineadas cada una sobre la pluralidad de cámaras de reacción del segundo cartucho microfluídico cuando el segundo receptáculo está sosteniendo el segundo cartucho microfluídico. El segundo cabezal detector puede ubicarse sobre la placa de aberturas, y puede moverse a lo largo del riel de manera que cada una de la pluralidad de pares de fotodetectores y fuentes de luz en la primera fila del segundo cabezal detector puede colocarse sobre cada abertura en la primera fila de la segunda placa de aberturas, y cada una de la pluralidad de pares de fotodetectores y fuentes de luz en la segunda fila del segundo cabezal detector puede colocarse sobre cada abertura en la segunda fila de la segunda placa de aberturas.

30 En algunas realizaciones, los pares de fotodetectores y fuentes de luz pueden incluir al menos seis pares de fotodetectores y fuentes de luz diferentes que operan 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 una luz de color carmesí. En algunas realizaciones, el cabezal detector incluye al menos N filas de fotodetectores y pares de fuentes de luz, y el detector está configurado para moverse al menos a $M + N - 1$ posiciones sobre una placa de aberturas que comprende M filas de aberturas.

35 En algunas realizaciones, la placa de aberturas comprende acero, aluminio, níquel o una combinación de estos. En algunas realizaciones, la placa de aberturas puede tener un grosor de aproximadamente 0,63 cm (0,25 pulgadas). En algunas realizaciones, al menos parte de la placa de aberturas se oxida electroquímicamente para que sea más oscura que cuando la placa de aberturas no se oxida electroquímicamente. En algunas realizaciones, la placa de aberturas proporciona una presión sustancialmente uniforme a través del área del cartucho microfluídico, cuando está presente el cartucho dentro del receptáculo. En algunas realizaciones, la placa de aberturas comprende al menos uno de aluminio, zinc o níquel, comprendiendo además la placa de aberturas un colorante.

45 En algunas realizaciones, el aparato comprende además una placa calentadora, en la que la placa calentadora se coloca debajo del cartucho microfluídico cuando está presente un cartucho en el receptáculo. En algunas realizaciones, la placa calentadora comprende al menos uno de vidrio o cuarzo. En algunas realizaciones, la placa de aberturas proporciona una presión sustancialmente uniforme a través del área del cartucho microfluídico cuando está presente un cartucho dentro del receptáculo. La presión sustancialmente uniforme puede facilitar un contacto térmico sustancialmente uniforme entre las cámaras de reacción microfluídicas y la placa calentadora. Como tal, en algunas realizaciones, la placa de aberturas proporciona una presión uniforme que puede asegurar que cada una de la pluralidad de las cámaras de reacción o reactores en el cartucho microfluídico estén en contacto o comunicación térmica uniformemente con una pluralidad respectiva de elementos de calentamiento ubicados dentro de la placa calentadora.

55 En algunas realizaciones, el aparato comprende además un fotodetector, el fotodetector ubicado sobre la placa de aberturas, en el que la cámara microfluídica se configura para recibir luz en un ángulo de mira desde una fuente de luz con respecto al fotodetector. En algunas realizaciones, la placa calentadora comprende una pluralidad de elementos de calentamiento, en la que cada una de la pluralidad de los elementos de calentamiento se coloca de tal manera que cuando el cartucho microfluídico está presente en el receptáculo, la pluralidad de los elementos de calentamiento está en conexión térmica con cada una de la pluralidad de las cámaras de reacción, respectivamente.

60 En la presente memoria se divulga además un procedimiento implementado en uno o más procesadores informáticos para optimizar protocolos, tales como protocolos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o similares, para realizar simultáneamente una pluralidad de reacciones del ciclo térmico, en el que cada reacción de ciclo térmico comprende una o más etapas de detecciones, y en el que las reacciones del ciclo térmico se realizan en una pluralidad de reactores. El procedimiento puede incluir las etapas de determinar o proporcionar o acceder a un tiempo de ciclo de detección para cada una de la pluralidad de los reactores; recibir o acceder a una etapa del protocolo, la etapa asociada

con una duración de la etapa, la etapa que comprende un tiempo para la detección; y determinar un primer ajuste a la etapa, de modo que la duración de la etapa sea un múltiplo del tiempo del ciclo de detección.

5 El procedimiento divulgado puede comprender además determinar un segundo ajuste a la etapa, en el que el tiempo de detección es un múltiplo del tiempo del ciclo de detección cuando la etapa se ajusta mediante el primer ajuste y mediante el segundo ajuste. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende además determinar un ajuste de compensación inicial en base a una posición de una cámara de reacción asociada con el protocolo. En algunos ejemplos, el tiempo del ciclo de detección incluye la cantidad de tiempo requerida para que un cabezal del detector realice una pluralidad predeterminada de detecciones para una cámara de reacción. En algunos ejemplos, el tiempo del ciclo de detección incluye un tiempo requerido para el movimiento del cabezal detector a cada una de una pluralidad de reactores y el movimiento del cabezal detector a la posición de inicio. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende además iniciar el protocolo.

15 Ciertos ejemplos divulgados adicionalmente contemplan un medio legible por computadora no transitorio que comprende instrucciones, las instrucciones configuradas para hacer que uno o más procesadores realicen las siguientes etapas: determinar o proporcionar o acceder a un tiempo del ciclo de detección; recibir o acceder a una etapa del protocolo, en el que la etapa se asocia con una duración de la etapa, y en el que la etapa incluye un tiempo para la detección; y determinar un primer ajuste a la etapa de modo que la duración de la etapa sea un múltiplo del tiempo del ciclo de detección.

20 En algunas divulgaciones adicionales, la etapa del protocolo se asocia con un protocolo de una pluralidad de protocolos. Cada una de la pluralidad de protocolos puede asociarse con al menos una de una pluralidad de reacciones de ciclo térmico, tales como los protocolos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que cada reacción del 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 una sincronización de una o más etapas de detección, asociadas con las reacciones del ciclo térmico de al menos dos o más de la pluralidad de los protocolos cuando se ejecutan simultáneamente dos o más de la pluralidad de los protocolos. En algunos ejemplos, el procedimiento incluye además la etapa de determinar un segundo ajuste a la etapa, en el que el tiempo de detección es un múltiplo del tiempo del ciclo de detección cuando la etapa se ajusta mediante el primer ajuste y el segundo ajuste. En algunos ejemplos, el procedimiento incluye además la etapa de determinar un ajuste de compensación inicial en base a una posición de una cámara de reacción asociada con el protocolo. En algunos ejemplos, el tiempo del ciclo de detección incluye la cantidad de tiempo requerida para que un cabezal detector realice una pluralidad predeterminada de detecciones para una cámara de reacción. En algunos ejemplos, el tiempo del ciclo de detección incluye además un tiempo requerido para el movimiento del cabezal detector a cada una de una de la pluralidad de las posiciones de detección de la cámara de reacción y el movimiento del cabezal detector a una posición de inicio. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende además iniciar el protocolo.

35 Ciertas divulgaciones adicionales contemplan un sistema para optimizar los 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 del ciclo de detección; recibir o acceder a una etapa del protocolo, en el que la etapa puede asociarse con una duración de la etapa, y en el que la etapa incluye un tiempo para la detección; y determinar un primer ajuste a la etapa de modo que la duración de la etapa sea un múltiplo del tiempo del ciclo de detección.

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

50 Se divulga además un procedimiento para realizar simultáneamente PCR en tiempo real en una pluralidad de cámaras de reacción de PCR, que comprende: (a) proporcionar un tiempo de análisis suficiente para que un conjunto de detectores realice un ciclo de análisis durante el cual puede analizar cada una de la pluralidad de las cámaras de reacción de PCR para al menos una señal detectable y estar listo para repetir el análisis; (b) proporcionar un protocolo de reacción para cada una de las cámaras de reacción de PCR que incluye múltiples ciclos, cada ciclo comprende un tiempo del 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 del ciclo de lectura durante el cual el conjunto detector debe analizar la cámara de reacción para al menos una señal detectable; (c) determinar, mediante el uso de un procesador, si el tiempo

del ciclo para esa cámara de reacción es el mismo o un múltiplo entero del tiempo del análisis, y si no, ajustar el tiempo del análisis o el tiempo del ciclo para que el tiempo del ciclo sea el mismo como o un múltiplo entero del tiempo del análisis; (d) realizar al menos las etapas (b) y (c) para el protocolo de la reacción para cada una de la pluralidad de las cámaras de reacción de PCR, de modo que el tiempo del ciclo para cada protocolo de reacción sea el mismo o un múltiplo entero del tiempo del análisis; y (e) bajo la dirección de un procesador, realizar una PCR en tiempo real en cada una de las cámaras de reacción mediante el uso del protocolo de la reacción para cada una de las cámaras de reacción, que incluye la realización de múltiples ciclos de análisis con el conjunto del detector, en el que cada cámara de reacción de PCR se analiza por el conjunto del detector durante cada período del ciclo de lectura para esa cámara de reacción.

En algunos ejemplos, el procedimiento comprende además el ajuste de la fase del tiempo del ciclo del protocolo de la reacción para al menos una de las cámaras de reacción. En algunos ejemplos, al menos uno de dichos protocolos de reacción es diferente de otro de dichos protocolos de reacción. En algunos ejemplos, al menos un tiempo del ciclo en un protocolo de la reacción es diferente del tiempo del ciclo en otro protocolo de la reacción.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una vista frontal de un aparato de diagnóstico divulgado en la presente memoria.

La Figura 1B es una vista en perspectiva superior del aparato de diagnóstico de la Figura 1A que muestra ciertos de los componentes internos del aparato.

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

La Figura 3A ilustra una vista superior de una posible disposición microfluidica dentro de ciertas realizaciones de un cartucho microfluidico como se describe en la presente memoria.

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

La Figura 4A ilustra una vista exterior del módulo óptico que incluye el cabezal detector de ciertas de las realizaciones descritas en la presente memoria.

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 detector usado dentro del módulo óptico de ciertas 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 utilizan en ciertas de las realizaciones del cabezal detector divulgada en la presente memoria.

La Figura 7 es un gráfico de la fluorescencia frente al tiempo de usar el PCR en tiempo real de los ácidos nucleicos objetivos realizada en un aparato de ciertas realizaciones como se describe en la presente memoria.

La Figura 8 es una representación abstracta de ciertas capas de la cámara, la abertura y el calentamiento que se encuentran en ciertas de las realizaciones descritas en la presente memoria.

Las Figuras 9A-H ilustran diversas perspectivas de una realización de la placa de aberturas.

La Figura 10 ilustra diversas dimensiones de las perspectivas de la placa de aberturas de las Figuras 9A-H.

La Figura 11 es un diagrama de una porción de un perfil térmico para un posible protocolo implementado en ciertos de los ejemplos.

La Figura 12 es un diagrama de flujo que muestra un proceso para determinar la duración del protocolo, las compensaciones y los 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 seleccionar las duraciones de ciertas etapas y subetapas del protocolo y la determinación del ajuste intraciclo que lo acompaña.

La Figura 14 es un diagrama de un perfil térmico que comprende un ajuste entre ciclos.

Las Figuras 15A-C representan una pluralidad de perfiles térmicos para una pluralidad de protocolos implementados en ciertos de los ejemplos. Las Figuras 15A y 15B ilustran el carácter de los perfiles de los protocolo antes del ajuste de compensación inicial. La Figura 15C ilustra la pluralidad de perfiles de protocolos uno con respecto al otro después de aplicar los ajustes de compensación inicial.

La Figura 16 es un diagrama de un perfil térmico bajo enfriamiento activo tal como se implementa en ciertos de los ejemplos.

Descripción detallada

Ciertas de las realizaciones de la presente contemplan un aparato, conocido en la presente memoria como termociclador, que puede calentar y analizar consistentemente las cámaras microfluidicas. La amplificación de polinucleótidos, tales como por PCR en tiempo real, puede realizarse dentro de las cámaras microfluidicas. En algunas realizaciones, el termociclador puede configurarse para realizar termociclajes individuales y la detección de los protocolos en una pluralidad de cámaras de reacción microfluidicas dentro de un cartucho microfluidico. El termociclaje puede usarse para amplificar ácidos nucleicos, por ejemplo, DNA, RNA o similares, por ejemplo, mediante PCR en tiempo real u otros protocolos de amplificación de ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, dentro de las cámaras de reacción microfluidicas. El termociclador puede comprender un cabezal detector, que comprende una pluralidad de pares de detectores, por ejemplo, seis o más pares de cabezal de detector, en el que cada par de detector comprende una fuente emisora de luz, por ejemplo, un LED o similar, y un fotodiodo afín. En algunas realizaciones, cada par de detectores individuales se configura para generar y detectar la luz emitida por una porción fluorescente, por ejemplo, una sonda fluorescente, para indicar la presencia de un polinucleótido objetivo.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "microfluídico" se refiere a volúmenes de menos de 1 ml, preferentemente 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 intermedia. Debe entenderse que, a menos que se especifique claramente lo contrario, cuando se usa el término PCR en la presente memoria, se pretende cualquier variante de PCR que incluye, pero no se limitan a la PCR cuantitativa y en tiempo real, y cualquier otra forma de amplificación de polinucleótidos abarcadas.

10 El proceso de detección usado en el ensayo puede multiplicarse además para permitir mediciones concurrentes múltiples en reacciones concurrentes múltiples. Se divulga adicionalmente que estas mediciones pueden tomarse desde cámaras de reacción separadas. Ciertos de estos ejemplos realizan una pluralidad de reacciones de PCR simultáneamente en una única cámara de reacción de PCR, por ejemplo, PCR múltiple. Un protocolo de PCR puede comprender pautas para realizar la hibridación sucesiva y la desnaturalización de los polinucleótidos en la cámara de reacción antes de la detección. Dichas pautas, comprenden un perfil de tiempo para calentar la cámara, pueden
15 conocerse como "protocolo". Ciertas de las realizaciones divulgadas facilitan el calentamiento y/o el enfriamiento consistente a través de una pluralidad de cámaras de reacción que realizan el PCR, al tiempo que facilitan la detección mediante el uso de una matriz de sensores. En ciertas realizaciones, el aparato puede comprender una placa de aberturas que facilita el calentamiento y el enfriamiento consistente de las cámaras de reacción aplicando presión a un cartucho que contiene una pluralidad de cámaras de reacción del PCR. Ciertos detalles y procedimientos para procesar polinucleótidos pueden encontrarse en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2009-0131650 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2010-0009351.

25 El experto en la técnica apreciará que las realizaciones divulgadas en la presente memoria son útiles para diversos tipos de reacciones de amplificación del ácido nucleico. Por ejemplo, los procedimientos de amplificación del ácido nucleico en relación con las realizaciones divulgadas en la presente memoria pueden incluir, pero no se limitan a: la reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), por ejemplo, amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), reacción en cadena de la ligasa (LCR), inmunoamplificación, y una variedad de procedimientos de amplificación en base a la transcripción, que incluyen la amplificación mediada por la transcripción (TMA), amplificación en base a la secuencia del ácido nucleico (NASBA),
30 replicación de secuencia autosostenida (3SR), y amplificación de círculo rodante. Véase, por ejemplo, Mullis, "Process for Amplifying, Detecting, and/or Cloning Nucleic Acid Sequences," patente de Estados Unidos núm. 4,683,195; "Strand Displacement Amplification," patente de Estados Unidos núm. 5,455,166; Dean y otros, "Multiple displacement amplification," patente de Estados Unidos núm. 6,977,148; Notomi y otros, "Process for Synthesizing Nucleic Acid," patente de Estados Unidos núm. 6,410,278; Landegren y otros, La patente de Estados Unidos núm. 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 de Estados Unidos núm. 5,427,930; Cashman, "Blocked-Polymerase Polynucleotide Immunoassay Method and Kit," patente de Estados Unidos núm. 5,849,478; Kacian y otros, "Nucleic Acid Sequence Amplification Methods," patente de Estados Unidos núm. 5,399,491; Malek y otros, "Enhanced Nucleic Acid Amplification Process," patente de Estados Unidos núm. 5,130,238; Lizardi y otros, BioTechnology, 6:1197 (1988);
40 Lizardi y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,854,033 "Rolling circle replication reporter systems."

En algunos ejemplos divulgados en la presente memoria, el ácido nucleico objetivo, por ejemplo, el amplicón objetivo, puede detectarse mediante el uso de una sonda de oligonucleótidos. Preferentemente, las sondas incluyen uno o más porciones detectables que pueden detectarse por los sistemas divulgados en la presente memoria. El experto en la técnica apreciará que varias tecnologías de sonda son útiles en los ejemplos descritos en la presente memoria. A modo de ejemplo, las realizaciones divulgadas en la presente memoria pueden usarse con sondas TAQMAN®, sondas de baliza molecular, sondas SCORPION™ y similares.

50 Los ensayos TaqMan® son ensayos homogéneos para detectar polinucleótidos (véase la patente de Estados Unidos núm. 5,723,591). En los ensayos TAQMAN®, dos cebadores de PCR flanquean un oligonucleótido de sonda TAQMAN® central. El oligonucleótido de sonda contiene un fluoróforo y un inhibidor. Durante la etapa de polimerización del proceso de PCR, la actividad nucleasa 5' de la polimerasa escinde el oligonucleótido sonda, lo que hace que la porción fluorófora se separe físicamente del inhibidor, lo que aumenta la emisión de la fluorescencia. A medida que se crea más producto de PCR, aumenta la intensidad de emisión a la longitud de onda novedosa.

55 Las sondas moleculares son una alternativa a las sondas TAQMAN® para la detección de polinucleótidos, y se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 6,277,607; 6,150,097; y 6,037,130. Las sondas moleculares son horquillas de oligonucleótidos que experimentan un cambio conformacional al unirse a un molde emparejado perfectamente. El cambio conformacional del oligonucleótido aumenta la distancia física entre una porción fluorófora y una porción inhibidora presente en el oligonucleótido. Este aumento en la distancia física hace que disminuya el efecto del inhibidor, aumentando así la señal derivada del fluoróforo.

60 El procedimiento 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 con regiones adyacentes de la secuencia objetivo, una de las sondas marcada con un fluoróforo receptor y la otra sonda marcada con un fluoróforo donante de un par de transferencia de energía fluorescente. Tras la hibridación de las dos sondas con la secuencia objetivo, el

fluoróforo donante interactúa con el fluoróforo receptor para generar una señal detectable. La muestra después se excita con luz a una longitud de onda absorbida por el fluoróforo donante y se detecta la emisión fluorescente del par de transferencia de energía de fluorescencia para la determinación de esa cantidad objetivo. La patente de Estados Unidos núm. 6,174,670 divulga tales procedimientos.

Los cebadores Sunrise utilizan una estructura de horquilla similar a las sondas moleculares, pero unida a una secuencia de unión al objetivo que sirve como un cebador. Cuando se sintetiza la cadena complementaria del cebador, la estructura de la horquilla se rompe, eliminando de este modo la inhibición. Estos cebadores detectan el producto amplificado y no requieren el uso de una polimerasa con una actividad exonucleasa 5'. Los cebadores Sunrise se describen en Nazarenko y otros. (Nucleic Acids Res. 25: 2516-21 (1997) y en la patente de Estados Unidos núm. 5,866,336.

Las sondas SCORPION™ combinan un cebador con una estructura de horquilla adicional, similar a los cebadores Sunrise. Sin embargo, la estructura de horquilla de las sondas SCORPION™ no se abre por la síntesis de la cadena complementaria, sino por hibridación de la porción de la estructura de horquilla con una porción del objetivo que está más abajo de la porción que hibrida con el cebador.

El DzyNA-PCR implica un cebador que contiene la secuencia antisentido de una ADNzima, un oligonucleótido capaz de escindir los enlaces fosfodiéster de ARN específicos. El cebador se une a una secuencia objetivo y conduce una reacción de amplificación que produce un amplicón que contiene la ADNzima activa. La ADNzima activa escinde después un sustrato indicador genérico en la mezcla de reacción. El sustrato indicador contiene un par de fluoróforo-inhibidor, y la escisión del sustrato produce una señal de fluorescencia que aumenta con la amplificación de la secuencia objetivo. El DNAzy-PCR se describe en Todd y otros, Clin. Chem. 46:625-30 (2000), y en la patente de Estados Unidos núm. 6,140,055.

Fiandaca y otros, describen un procedimiento fluorogénico para el análisis por PCR utilizando una sonda de ácido nucleico peptídico marcado con inhibidor (Q-PNA) y un cebador oligonucleotídico marcado con fluoróforo. Fiandaca y otros, Genome Research. 11: 609-613 (2001). El Q-PNA se hibrida con una secuencia etiqueta en el extremo 5' del cebador.

Li y otros, describen una sonda de doble cadena que tiene un inhibidor y fluoróforo en cadenas de oligonucleótidos opuestas. Li y otros Nucleic Acids Research. 30 (2): e5, 1-9 (2002). Cuando no se une al objetivo, las cadenas se hibridan entre sí y la sonda se inhibe. Sin embargo, cuando está presente un objetivo, al menos una cadena hibrida con el objetivo dando como resultado una señal fluorescente.

Los marcadores y porciones de fluoróforo útiles en los ejemplos divulgados en la presente memoria 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 pueden usarse 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 de los lantánidos quelados, la familia de colorantes disponibles bajo la designación comercial Alexa Fluor J, de Molecular Probes, y la familia de colorantes disponibles bajo la designación comercial Bodipy J, de Invitrogen (Carlsbad, California). Los colorantes de la familia de 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-carboxifluoresceína (ZOE). Los colorantes de la familia de las carboxirodaminas incluyen tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), tetrapropano-6-carboxirodamina (ROX), Texas Red, R110 y R6G. Los colorantes de la familia de las cianinas incluyen Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7. Los fluoróforos están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Perkin-Elmer (Ciudad Foster, California), Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregón), y Amersham GE Healthcare (Piscataway, Nueva York).

Como se discutió anteriormente, en algunos ejemplos, las sondas útiles en los ejemplos divulgados en la presente memoria pueden comprender un inhibidor. Los inhibidores pueden ser inhibidores fluorescentes o no fluorescentes. Los inhibidores fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, TAMRA, ROX, DABCYL, DABSYL, los colorantes de la cianina, que incluyen el azul de nitrotiazol (NTB), antraquinona, verde de malaquita, nitrotiazol y los compuestos del nitroimidazol. Los ejemplos de inhibidores no fluorescentes que disipan la energía absorbida de un fluoróforo incluyen los disponibles bajo la designación comercial Black Hole™ de Biosearch Technologies, Inc. (Novato, California), los disponibles bajo la designación comercial Eclipse™. Dark, de Epoch Biosciences (Bothell, Washington), los disponibles bajo la designación comercial Qx1J, de Anaspec, Inc. (San José, California), y los disponibles bajo la designación comercial Iowa Black™ de Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa).

En algunos ejemplos discutidos anteriormente, un fluoróforo y un inhibidor se usan juntos, y pueden estar en el mismo o en diferentes oligonucleótidos. Cuando se combinan, un fluoróforo y un inhibidor fluorescente pueden denominarse fluoróforo donante y fluoróforo aceptor, respectivamente. En la técnica se conocen varios pares convenientes de fluoróforo/inhibidor (véase, por ejemplo, Glazer y otros, Current Opinion in Biotechnology, 1997;8:94-102; Tyagi y otros,

1998, Nat. Biotechnol., 16:49-53) y están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Molecular Probes (Ciudad Junction, Oregón) y Applied Biosystems (Ciudad Foster, California). Los ejemplos de fluoróforos donantes que pueden usarse con diversos fluoróforos aceptores incluyen, pero no se limitan a, la fluoresceína, Lucifer Yellow, B-ficoeritrina, 9-acridinisotiocianato, Lucifer Yellow VS, 4-acetamido-4'-isotio-cianostilbeno-2,2'-ácido -disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, succinimidil 1-pirenobutirato y derivados del 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-ácido disulfónico. Los fluoróforos aceptores típicamente dependen del fluoróforo donante usado. Los ejemplos de fluoróforos aceptores incluyen, pero no se limitan a, LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, Cy5.5, Cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B, isotiocianato de tetrametil rodamina, isotiocianato de rodamina x, isotiocianato de eritrosina, fluoresceína, pentaacetato de dietilentriamina u otros quelatos de iones Lantánidos (por ejemplo, Europio o Terbio). Los fluoróforos donantes y aceptores están fácilmente disponibles comercialmente en, por ejemplo, Molecular Probes o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri). Los pares de fluoróforo/inhibidor útiles en las composiciones y procedimientos divulgados en la presente memoria son conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, descritos en S. Marras, "Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes" disponible en el sitio web mundial molecular-beacons.org/download/marras,mmb06%28335%293.pdf (a partir del 11 de abril del 2012).

El proceso de detección usado en los ensayos divulgados en la presente memoria permite ventajosamente múltiples mediciones concurrentes de múltiples porciones detectables, por ejemplo, una pluralidad de cebadores que contienen diferentes porciones detectables, etc. En algunos ejemplos, estas mediciones pueden tomarse desde cámaras de reacción separadas dentro de un cartucho microfluídico, por ejemplo, que comprende una capa de cámara (la capa de cámara que se refiere en la presente memoria a esa porción del cartucho microfluídico que contiene las cámaras de reacción). Algunos de estos ejemplos realizan una pluralidad de reacciones de amplificación simultáneamente en una única cámara de reacción, por ejemplo, PCR múltiple. Un protocolo de PCR puede comprender pautas para realizar la hibridación sucesiva y la desnaturalización de los polinucleótidos en la cámara de reacción antes de la detección. En ciertas realizaciones, el aparato se configura para facilitar el calentamiento y/o enfriamiento consistente a través de una pluralidad de cámaras de reacción para realizar la amplificación del ácido nucleico, y para facilitar la detección de amplicones objetivo en cámaras de reacción individuales, por ejemplo, mediante la detección de emisiones fluorescentes, mediante el uso de una matriz de sensores.

En ciertas realizaciones, el aparato puede comprender una placa de aberturas que facilita el calentamiento y el enfriamiento consistente de las cámaras de reacción aplicando presión a un cartucho que contiene una pluralidad de cámaras de reacción a través de múltiples, pares ópticos independientes. La placa de aberturas se configura preferentemente para permitir y facilitar la generación y la detección de señales fluorescentes de cebadores dentro de múltiples cámaras de reacción independientes. En algunas realizaciones, la placa de aberturas se configura de modo que haya una abertura individual (o ventanas), colocada sobre cada una de las cámaras de reacción individuales en el cartucho microfluídico.

Aparato de diagnóstico

Las Figuras 1A y 1B muestran un aparato de diagnóstico 10 de ciertas de las realizaciones presentes. En la realización ilustrada en la Figura 1A, el aparato de diagnóstico incluye un alojamiento de aparato 30. El alojamiento 30 puede garantizar un entorno controlado para el procesamiento de las muestras de microfluidos y para evitar que entre la luz no deseada en el espacio de detección. El alojamiento 30 puede comprender una cubierta 16 que incluye un asa 14 y una ventana translúcida 12. La cubierta 16 puede bajarse para cerrar la abertura en la parte delantera del aparato de diagnóstico 10 cuando el aparato de diagnóstico 10 está en funcionamiento.

Como se ve en las realizaciones de las Figuras 1A y 1B, el aparato de diagnóstico 10 puede alojar dos estantes de muestras 24a, 24b en la porción delantera del aparato de diagnóstico 10. Sin embargo, el experto en la técnica apreciará que la representación del aparato de diagnóstico en las Figuras 1A y 1B es solo a modo de ejemplo, y que en algunas realizaciones, el aparato puede configurarse para alojar más de dos estantes de muestras, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más estantes de muestras. Preferentemente, el aparato se configura para alojar el mismo número de estantes de muestras, por ejemplo, dos, como cartuchos microfluídicos.

En algunas realizaciones, cada estante de muestra 24a, 24b puede incluir múltiples soportes 26. Los soportes 26 pueden incluir receptáculos para contener reactivos de diagnóstico, tales como reactivos para la amplificación del ácido nucleico, por ejemplo, reactivos de PCR o similares. Los estantes 24 pueden incluir además tubos de muestras (no mostrados) y tubos de mezcla (no mostrados) para preparar muestras listas para el diagnóstico, tales como muestras listas para la amplificación. El aparato puede preparar los reactivos deseados en los estantes 24a, 24b mediante el uso del dispensador 400. Puede encontrarse una descripción adicional de diversos dispensadores de fluidos en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2009-0130719 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2009-0155123.

En algunas realizaciones, las cámaras de reacción dentro de los cartucho(s) microfluídico(s) incluyen uno o más reactivos, tampones, etc., usados en el ensayo de amplificación nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las cámaras de reacción del cartucho microfluídico pueden incluir, por ejemplo, cebadores de amplificación, sondas, nucleótidos, enzimas tales como la polimerasa, agentes tamponantes o similares. A modo de ejemplo, en algunas

realizaciones, las cámaras de reacción pueden incluir reactivos liofilizados, a los que se agrega la muestra biológica procesada (por ejemplo, una solución de ácidos nucleicos extraídos). Los fluidos preparados pueden transferirse después a un cartucho microfluídico y pueden insertarse en los módulos calentadores/ópticos 500a, 500b para su procesamiento y análisis.

La Figura 1A es una vista frontal del aparato de diagnóstico 10 de ciertas 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 riel lateral 20. El riel lateral 20 puede ser parte de una grúa pórtico accionada por motor 18, que puede incluir además un riel hacia adelante y hacia atrás 22 (no mostrado). El riel hacia adelante y hacia atrás 22 puede conectarse al riel lateral 20 y montarse perpendicularmente al riel lateral 20 en el aparato de diagnóstico 10.

La Figura 1A ilustra adicionalmente la cubierta 28 sobre los módulos calentamiento/óptico 500a, 500b. Las bandejas receptoras 520a y 520b pueden ubicarse debajo o dentro de los alojamientos de los módulos calentamiento/óptico 500a, 500b. La bandeja receptora 520a se ilustra en una posición abierta, haciendo que esté disponible para recibir un cartucho microfluídico 200. La bandeja receptora 520b se ilustra en una posición cerrada, los reactivos no solo se colocan en la posición adecuada para el procesamiento, sino que además protegen aún más el interior de los módulos calentador/óptico de recibir cualquier luz extraviada no deseada. Si se introduce luz extraviada en el área de detección, el sistema puede identificar niveles fluorescentes erróneos derivados de la luz que no se emite desde la cámara de la reacción.

La Figura 1B es una vista en perspectiva del aparato de diagnóstico 10 que muestra ciertos de los componentes internos del aparato. Para ilustrar mejor ciertas características, el alojamiento del aparato 30, la cubierta 16 y la cubierta calentador/óptico 28 encontrados en la Figura 1A se han eliminado de la vista en la Figura 1B. En la Figura 1B se muestra la grúa pórtico 18, que incluye el riel lateral 20 del riel hacia adelante y hacia atrás 22. El dispensador de fluido 400 puede montarse en el riel lateral 20 y puede deslizarse lateralmente a lo largo del riel lateral largo 20. El riel lateral 20 puede conectarse al riel hacia adelante y hacia atrás 22 que puede moverse en la dirección hacia adelante y hacia atrás. De esta manera, el dispensador de fluido 400 está disponible para moverse en la dirección X, Y a través del dispositivo de diagnóstico 10. Como se describe a continuación, el dispensador de fluido 400 puede moverse además hacia arriba y hacia abajo en el plano z en el riel lateral 20, dando de este modo al dispensador 400 la capacidad de moverse en tres grados direccionales a través del dispositivo de diagnóstico 10.

En la Figura 1B se muestran además los módulos calentamiento/óptico 500a, 500b con la cubierta 28 de los módulos calentamiento/óptico de la Figura 1A eliminados. Las bandejas receptoras 520a y 520b se representan en la posición abierta y cada una contiene los cartuchos 200. En algunas realizaciones, las bandejas receptoras pueden incluir cada una un sustrato calentador 600 (no mostrado) debajo de cada uno de los cartuchos microfluídicos 200. Los módulos calentamiento/óptico 500a, 500b pueden incluir además cada uno un cabezal detector 700 descrito con mayor detalle a continuación.

Como se describirá con más detalle a continuación, el aparato de diagnóstico 10 puede ser capaz de realizar diagnósticos en tiempo real en una o más muestras. La muestra a analizar puede colocarse primero en un tubo de muestra (no mostrado) en el estante 24a o 24b. Los reactivos de diagnóstico pueden ubicarse en los soportes 26 en el estante 24a dentro del aparato de diagnóstico 10. El dispensador de fluido 400 puede mezclar y preparar la muestra para pruebas de diagnóstico y después puede entregar la muestra preparada al cartucho microfluídico 200 para el ciclo térmico y la detección de analitos en los módulos calentamiento/óptico 500a, 500b. Alternativamente, el dispensador de fluido 400 puede suministrar muestras de ácido nucleico a las cámaras de reacción del cartucho microfluídico, en el que las cámaras de reacción del cartucho microfluídico ya contienen reactivos para una reacción de amplificación.

La Figura 2 ilustra una vista interior del aparato de diagnóstico 10, que muestra el estante 24a que soporta varios tubos de muestra 32 y soportes de reactivos 26, y un cartucho 200 situado en la bandeja receptora 520a. La bandeja receptora 520a está en una posición abierta que se extiende desde el módulo calentamiento/óptico 500a que tiene la cubierta 28 unida. La bandeja receptora 520b está en una posición cerrada. Favorablemente, en algunas realizaciones, las bandejas receptoras 520a, b pueden permitir la colocación fácil del cartucho microfluídico 200, por un usuario o por un dispositivo de carga automática. Tal diseño puede acomodar además el pipeteo múltiple de muestras mediante el uso del dispensador de fluido robótico 400.

Bandeja receptora

Como se ilustra en la Figura 2, el compartimento empotrado 524 puede ser una porción de la bandeja receptora 520 que se configura para recibir selectivamente el cartucho microfluídico 200. Por ejemplo, el compartimento empotrado 524 y el cartucho microfluídico 200 pueden tener un borde 526 que tiene una forma complementaria para que el cartucho microfluídico 200 se reciba selectivamente en, por ejemplo, una sola orientación. Por ejemplo, el cartucho microfluídico 200 puede tener un miembro de registro 202 que se coloca en una característica complementaria del compartimento. 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 técnica apreciará fácilmente que la complementariedad entre el cartucho y el compartimento receptor puede lograrse fácilmente mediante el uso de otras disposiciones adecuadas, por ejemplo, una post o protuberancia que se coloca dentro de una abertura. Al recibir

selectivamente el cartucho 200, el compartimento empotrado 524 puede ayudar a un usuario a colocar el cartucho 200 para que el módulo óptico 502 pueda funcionar correctamente en el cartucho 200. De esta manera, puede lograrse una alineación de los cartuchos 200 sin errores.

5 La bandeja receptora 520 puede alinearse de modo que diversos componentes del aparato que pueden operar en el cartucho de microfluidos 200 (tales como fuentes de calor, detectores, elementos de fuerza y similares) estén posicionados para operar adecuadamente en el cartucho de microfluidos 200 mientras que el cartucho 200 se recibe en el compartimento empotrado 524 de la bandeja receptora 520. Por ejemplo, las fuentes de calor de contacto en el sustrato del calentador 600 pueden colocarse en el compartimento empotrado 524 de tal manera que las fuentes de calor pueden acoplarse térmicamente a ubicaciones distintas en el cartucho de microfluidos 200 que se recibe en la bandeja receptora 520.

Cartucho microfluídico

15 Ciertas realizaciones contemplan un cartucho microfluídico configurado para llevar a cabo la amplificación, tal como por PCR, de uno o más polinucleótidos de una o más muestras. Por cartucho se entiende una unidad que puede desecharse, o reutilizarse en su totalidad o en parte, y que puede configurarse para usarse junto con algún otro aparato que se haya configurado de manera adecuada y complementaria para recibir y operar en (tales como suministrar energía a) el cartucho.

20 Por microfluídico, como se utiliza en la presente memoria, 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, tales como de 1-100 μ l, o de 2-25 μ l, como se definió anteriormente. Del mismo modo, como se aplica a un cartucho, el término microfluídico significa que diversos componentes y canales del cartucho, como se describe más adelante en la presente memoria, se configuran para aceptar, y/o retener, y/o facilitar el paso de volúmenes microfluídicos de la muestra, reactivo o del polinucleótido amplificado. Ciertas realizaciones en la presente memoria pueden funcionar además con volúmenes de nanolitros (en el intervalo de 10-500 nanolitros, tales como 100 nanolitros).

30 La Figura 3A es una vista a superior de un cartucho microfluídico 200. El cartucho 200 puede comprender una pluralidad de carriles de muestra 1706a-c. Los carriles pueden conducir a cámaras de PCR 1703 ubicadas en los lados "izquierdo" y "derecho" (es decir, filas) del cartucho. Como se indica en la Figura 3a, los carriles pueden proporcionar puertos de entrada 1705 en una ubicación conveniente cerca del usuario. Sin embargo, los carriles a los que están conectados los puertos pueden tomar trayectorias independientes para separar las cámaras 1703a-c. En la realización de la Figura 3a, por ejemplo, el primer carril 1706a está en comunicación con la primera cámara 1703a del lado izquierdo, el segundo carril 1706b está en comunicación con la primera cámara del lado derecho 1703b, el tercer carril 1706c está en comunicación con la segunda cámara 1703c del lado izquierdo, etc. Cada uno de los carriles microfluídicos puede comprender además válvulas microfluídicas 1702, 1704, compuertas microfluídicas y canales microfluídicos. Estas compuertas y válvulas pueden configurarse, por ejemplo, por accionamiento térmico, para facilitar la liberación temporizada y la difusión controlada de ciertos fluidos dentro de los carriles 1706 del cartucho 200. El cartucho de esta realización puede comprender orificios de ventilación 1701 que evitan que el aire bloquee el paso del fluido dentro del cartucho. La descripción adicional de diversos componentes del cartucho, tales como válvulas, pueden encontrarse por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2009-0130719.

45 El cartucho microfluídico 200 puede incluir un miembro de registro 202, por ejemplo, un recorte, que corresponde a un borde complementario en el compartimento empotrado 524 de la bandeja receptora 520a,b de los módulos calefactores/ópticos 500a, 500b. El miembro de registro 202 y el borde complementario 526 pueden permitir la colocación segura y correcta del cartucho microfluídico 200 en la bandeja receptora 520a, b.

50 En diversas realizaciones, los componentes de una red microfluídica en los carriles de muestra 1706 del cartucho 200 pueden calentarse acoplándolos térmicamente con los calentadores en un sustrato calentador 600. El sustrato calentador 600 puede configurarse para calentar una mezcla de muestra que comprende reactivos de amplificación y una muestra de polinucleótido lista para la amplificación y hacer que experimente condiciones de ciclo térmico adecuadas para crear amplicones a partir de la muestra lista para amplificación. El sustrato calentador 600 puede ubicarse en el cartucho 200 en algunas realizaciones o en el compartimento empotrado 524.

55 La red microfluídica en cada carril puede configurarse para llevar a cabo la amplificación del ácido nucleico, tal como por PCR, en una muestra lista para la 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 someterse a condiciones de ciclo térmico para crear amplicones a partir de la muestra de polinucleótidos extraída. Por ejemplo, una muestra lista para la amplificación, tales 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 porción del ácido nucleico de control positivo y una pluralidad de nucleótidos, y al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos objetivo. La red microfluídica puede configurarse para acoplar calor de una fuente de calor externa con la mezcla que comprende el reactivo de PCR y la muestra de polinucleótido extraída en condiciones de ciclo térmico adecuadas para crear amplicones de PCR a partir de la muestra de polinucleótido extraída.

Se divulga adicionalmente en la presente memoria que la mezcla de reactivos puede comprender marcadores fluorescentes u otros ópticamente detectables para la detección de la generación de un amplicón deseado. En algunos ejemplos, pueden usarse múltiples conjuntos de cebadores y múltiples etiquetas en un formato de ensayo múltiple, por ejemplo, PCR múltiple, donde cada una de una pluralidad de amplicones diferentes puede detectarse en una cámara de reacción única, si está presente. Por ejemplo, una cámara de ensayo podría incluir ácidos nucleicos molde de una muestra de prueba, ácidos nucleicos molde 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. Además, el experto en la técnica apreciará que en algunas realizaciones, el cartucho microfluídico acomoda un polinucleótido de control negativo que no producirá un amplicón con pares de cebadores usados para amplificar las secuencias de control positivo o el objetivo.

En algunas de las realizaciones ilustradas, las cámaras 1703a-c asociadas respectivamente con cada carril 1706a-c de un cartucho 200 de múltiples carriles pueden realizar reacciones de amplificación independientes. Los resultados de las reacciones para la primera columna de las cámaras (1703a, 1703b) para los dos primeros carriles (1706a, 1706b) pueden medirse después de forma simultánea e independiente mediante el uso de un cabezal detector que comprende un par fuente de luz-fotodetector "izquierda" y "derecha". Es decir, cada cámara 1703a-b de cada carril 1706a-b puede recibir luz de una fuente de luz separada y observarse por un fotodetector separado simultáneamente. De esta manera, puede realizarse una variedad de combinaciones de reacciones en el cartucho eficientemente. Por ejemplo, en algunos ejemplos, pueden realizarse una pluralidad de ensayos de amplificación para la detección de una pluralidad de ácidos nucleicos objetivo en un carril, un control positivo y un control negativo en otros dos carriles; 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 un carril, con un control negativo en un carril separado. En un ejemplo particular, 2, 3, 4, 5, 6 o más ensayos se realizan en un solo carril, con al menos ese número de fluoróforos fluorescentes distintos en la cámara de reacción.

Un cartucho microfluídico 200 puede construirse a partir de varias capas. Como consecuencia, un aspecto de la presente tecnología se refiere a un cartucho microfluídico que comprende una primera, segunda, tercera, cuarta y quinta capas en la que una o más capas definen una pluralidad de redes microfluídicas, cada red tiene componentes diversos 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 microfluídico 200 puede comprender una pluralidad de carriles, cada uno de los cuales incluye una cámara de reacción, grabada o moldeada en un solo plano, tales como en un sustrato de plástico moldeado, con cada carril cerrado por una capa de cobertura, tal como un capa de película de plástico adhesivo. Se contemplan realizaciones con 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 30 o más carriles por cartucho. Por ejemplo, un diseño adecuado es un cartucho único 200 que tiene 24 cámaras de reacción, dispuestas en dos filas de 12 cámaras de reacción, que opcionalmente tienen puertos de entrada alineados relativamente. Una descripción adicional de diversos cartuchos y sus componentes puede encontrarse en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2008-0182301 y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos 2009-0130719.

Sustrato calentador

En la Figura 3B se muestra una vista superior de ciertas realizaciones del sustrato calentador 600. Puede usarse cualquier tipo de calentador, que incluye los calentadores resistivos, Peltier o de fluido móvil, con enfriamiento pasivo o activo contemplado. Una de las muchas realizaciones posibles incluye una pluralidad de calentadores resistivos en contacto térmico con cada cámara de reacción, que preferentemente incluye además uno o más sensores de temperatura. Debido a que los calentadores resistivos exhiben además algún efecto termistor, es decir, su resistencia cambia con la temperatura, los calentadores resistivos pueden funcionar como sensores de temperatura, lo que permite un control de la temperatura precisa de cada cámara de reacción mientras que simplifica el diseño del producto. Aunque los calentadores pueden controlarse en concierto entre sí, en algunas realizaciones cada cámara de reacción puede tener uno o más calentadores individuales en contacto térmico con los mismos, de modo que los calentadores pueden controlarse por separado y cada cámara de reacción puede calentarse y dejar enfriar independientemente de las otras cámaras de reacción. Esto permite que se realicen diferentes ensayos simultáneamente en cada una de una pluralidad de las cámaras de reacción. En la Figura 3B se muestra un conjunto de calentador resistivo particular para usar con una cámara de reacción individual. En la realización mostrada en la Figura 3B, cualquier combinación de un calentador/sensor de sensor superior 1604, un calentador/sensor de fondo 1603, un calentador/sensor lateral 1601 y un calentador/sensor central 1602 pueden usarse para calentar la cámara de reacción ubicada arriba. Para facilitar la comprensión, se superpone un contorno de la cámara de PCR 1703 de ciertas de las realizaciones sobre el sustrato calentador. En ciertas realizaciones, los calentadores en el sustrato calentador 600 pueden ser calentadores de contacto. Dichos calentadores de contacto pueden comprender (por ejemplo) un calentador resistivo (o una red de estos), un radiador, un intercambiador de calor fluídico y un dispositivo Peltier. La fuente de calor de contacto puede configurarse en el compartimento empotrado 524 para acoplarse térmicamente a una o más ubicaciones distintas del cartucho microfluídico 200 recibido en la bandeja receptora 520a, b por lo que las distintas ubicaciones se calientan selectivamente. Cada una de las fuentes de calor de contacto puede configurarse en el sustrato calentador 600 para acoplarse térmicamente de independientemente a una distinta ubicación en un cartucho microfluídico 200 recibido en la bandeja receptora 520a,b por lo que las distintas ubicaciones se calientan independientemente. Las fuentes de calor de contacto pueden configurarse ventajosamente para estar en contacto físico directo con distintas ubicaciones de un

5 cartucho microfluídico 200 recibido en la bandeja receptora 520a,b. En diversas realizaciones, cada calentador de fuente de contacto puede configurarse para calentar una distinta ubicación que tiene un diámetro promedio en 2 dimensiones de aproximadamente 1 milímetro (mm) a aproximadamente 15 mm (típicamente de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm), o una distinta ubicación que tiene un área superficial de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 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).

10 El sustrato calentador 600 puede organizarse en "carriles" 1605a, b paralelos a la estructura de los carriles 1706a-c del cartucho 200. En algunas realizaciones, el sustrato calentador 600 puede incluir 24 carriles calentadores 1605a, 1605b correspondientes a los carriles de muestra 1706 del cartucho 200. Cuando el cartucho microfluídico 200 se coloca en el compartimento empotrado 524 de la bandeja receptora 520a,b, los componentes del cartucho 200 pueden alinearse adyacentes, y encima, de los calentadores correspondientes en el sustrato calentador 600. Cuando el cartucho microfluídico 200 se coloca en el compartimento empotrado 524, los calentadores pueden estar en contacto físico con los componentes respectivos. En algunas realizaciones, los calentadores permanecen acoplados térmicamente a sus componentes respectivos, por ejemplo, a través de una o más capas o materiales intermedios, aunque no en contacto físico directo. La descripción adicional de carriles pueden encontrarse por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2009-0130719.

20 En algunas realizaciones, pueden configurarse múltiples calentadores para activarse de manera simultánea y uniforme para calentar sus respectivos componentes de cartucho adyacentes de la red microfluídica en el cartucho microfluídico 200. Cada calentador puede controlarse independientemente por un procesador y/o circuito de control usado junto con el aparato descrito en la presente memoria. Generalmente, el calentamiento de los componentes microfluídicos (compuertas, válvulas, cámaras, etc.) en el cartucho microfluídico 200, se controla pasando corriente a través de los calentadores microfabricados configurados adecuadamente. Bajo el control de una circuitería adecuada, los carriles 25 1706 de un cartucho de carriles múltiples pueden calentarse después independientemente y, de este modo, controlarse independientemente, uno del otro. Además, como se describe con más detalle a continuación, los calentadores individuales 1601-1604 pueden calentarse independientemente y, de este modo controlarse independientemente, uno del otro. Esto puede conducir a una mayor eficiencia energética y control del aparato, porque no todos los calentadores se calientan al mismo tiempo, y un calentador determinado recibe corriente solo durante esa fracción del tiempo cuando se requiere calentar.

30 El sustrato calentador 600 puede incluir además uno o más sensores de calor. Para reducir el número de sensores o calentadores requeridos para controlar los calentadores en los carriles del calentador 1605a, 1605b, los calentadores pueden usarse para detectar la temperatura así como el calor, y de este modo evitar la necesidad de tener un sensor dedicado separado para cada calentador. Por ejemplo, la impedancia y/o resistencia de algunos materiales cambian con la temperatura ambiente. Como consecuencia, la resistencia de los calentadores/sensores 1601-1604 puede usarse como una indicación de temperatura cuando los sensores no se calientan activamente.

35 En algunas realizaciones, los calentadores en el sustrato del calentador 600 pueden diseñarse para tener una potencia suficiente para permitir que los calentadores se agrupen en serie o en paralelo para reducir el número de elementos controlables electrónicamente, reduciendo de este modo la carga sobre los circuitos electrónicos asociados. Los calentadores que se agrupan de esta manera funcionarían bajo control sincronizado y sustancialmente simultáneo.

40 En algunas realizaciones, los calentadores de la cámara de reacción en lados opuestos de los calentadores de la segunda etapa pueden agruparse y configurarse para funcionar bajo control sincronizado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los calentadores de PCR/amplificación 1601-1602 pueden agruparse y configurarse para funcionar bajo control sincronizado. Pueden aplicarse agrupaciones y configuraciones alternativas a otros grupos de calentadores de los calentadores de PCR/amplificación 1601-1604. Los calentadores de PCR/amplificación 1601-1604 pueden configurarse para funcionar de forma individual e independientemente o pueden configurarse para operar en grupos de 45 dos (pares), tres (tercios), cuatro, cinco o seis.

50 En algunos ejemplos que no forman parte de la invención, el calentamiento puede controlarse encendiendo y apagando periódicamente la corriente a un calentador respectivo con modulación del ancho del pulso variable (PWM), en el que la modulación del ancho del pulso se refiere a la relación tiempo de encendido/tiempo de apagado de la corriente. La corriente puede suministrarse conectando un calentador microfabricado a una fuente de alta tensión (por ejemplo, 30 V), que puede activarse mediante la señal PWM. En algunas realizaciones, el dispositivo puede incluir 48 generadores de señal PWM. En algunas realizaciones habrá dos generadores de señal PWM asociados con cada cámara de reacción. El funcionamiento de un generador PWM puede incluir la generación una señal con un período programable elegido (el recuento final) y granularidad. Por ejemplo, la señal puede ser 4000 us (microsegundos) con una granularidad de 1 us, en cuyo caso el generador PWM puede mantener un contador que comienza en cero y avanza en incrementos de 1 us hasta llegar a 4000 us, cuando vuelve a cero. De este modo, la cantidad de calor producido puede ajustarse ajustando el conteo final. Un conteo final alto corresponde a un período de tiempo mayor durante el cual el calentador microfabricado recibe corriente y, por lo tanto, produce una mayor cantidad de calor.

65 En diversos ejemplos, la operación de un generador PWM puede incluir además un conteo de inicio programable adicional del conteo final y la granularidad, mencionados anteriormente. En tales ejemplos, múltiples generadores PWM

pueden producir señales que pueden no solaparse selectivamente (por ejemplo, al multiplicar el tiempo de encendido de los diversos calentadores) de modo que no se exceda la capacidad de corriente de la potencia de alta tensión.

Múltiples calentadores pueden controlarse por diferentes generadores de señales PWM con recuentos de inicio y fin variables. Los calentadores pueden dividirse en bancos, por lo que un banco define un grupo de calentadores del mismo recuento de inicio. El control de los elementos de calentamiento y los elementos de enfriamiento, si están presentes, en ciertas realizaciones se discute con más detalle a continuación.

Módulo óptico

Las Figuras 4A-C ilustran el módulo calentador/óptico 500 del aparato de detección 10 encontrado en ciertas realizaciones. El módulo calentador/óptico 500 puede comprender un módulo óptico 502 y una bandeja receptora 520 o una porción de la bandeja receptora. La Figura 4A muestra una realización del módulo óptico cerrado 502 que tiene un motor 504 unido externamente al mismo para impulsar el movimiento del cabezal detector 700. El cabezal detector 700 puede alojarse dentro del módulo óptico 502. La Figura 4A ilustra la bandeja receptora 520 acoplada a un lado inferior 506 del módulo óptico 502. La bandeja receptora 520 puede recibir un cartucho 200 que comprende muestras sobre las cuales se realizará la detección. Después de recibir las muestras, la bandeja receptora 520 puede moverse (por ejemplo, mecánicamente o manualmente) sobre los rieles 522 a una posición debajo del módulo óptico 502. En algunas realizaciones, descritas con mayor detalle a continuación, la bandeja receptora puede comprender un dispositivo de carga automática, que alinea automáticamente el cartucho una vez colocado debajo del módulo óptico 502. En algunas realizaciones, un compartimento empotrado 524 de la bandeja receptora 520 puede contener un sustrato calentador 600. En algunas realizaciones, la bandeja receptora puede elevarse posteriormente para colocar el cartucho en contacto con el módulo óptico 502, tal como en contacto con una placa de aberturas 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. En la Figura 4B se muestra el cabezal detector 700. Como se describe en detalle a continuación, el movimiento del cabezal detector 700 puede ser conducido por el motor 504 para moverse lateralmente a través del interior del módulo óptico 502 para proporcionar el barrido y la detección óptica en el cartucho 200 cuando el cartucho 200 se coloca debajo del módulo óptico 502 en la bandeja receptora 520. En la Figura 4B se muestra una placa de aberturas 540, colocada en el lado inferior 506 del módulo óptico 502.

La Figura 4C proporciona una vista inferior del módulo óptico 502. En la Figura 4C se muestra la placa de aberturas 540 y una placa normalizadora 546 unida a la parte inferior de la 506 del módulo óptico 502. La placa normalizadora puede usarse para calibrar los pares fuente de luz - fotodetectores del cabezal detector. La placa normalizadora 546 comprende uno o más componentes que tienen características ópticas estandarizadas conocidas, y se configura para calibrar, estandarizar o confirmar el funcionamiento adecuado del cabezal detector 700 y los circuitos asociados. La placa normalizadora 546 puede extenderse dentro del módulo óptico y el cabezal detector 700 puede colocarse sobre la placa normalizadora. En algunos ejemplos, antes del inicio de las mediciones ópticas del cartucho, el cabezal detector 700 se calibra mediante el uso de las propiedades conocidas de la placa normalizadora 546. Si el cabezal detector 700 no funciona correctamente, se pueden tomar medidas correctivas, tales como incluir una compensación en las mediciones o notificar al usuario sobre el error. En algunas realizaciones, la placa normalizadora puede hacerse de material transparente ópticamente 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 estandarizado para cada canal o color en el cabezal detector 700.

Como se muestra en la Figura 4C, la placa de aberturas 540 contiene aberturas 557. Las dimensiones de las aberturas 557 son tales que las fuentes de luz y los fotodetectores del detector pueden tener acceso (excitar o ver ópticamente) los contenidos en las cámaras de reacción del cartucho 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 está ubicado en una posición sobre una abertura particular, la luz puede viajar desde la fuente de luz y alcanzar el reactor de la cámara a través de la abertura 557. Los reactivos fluorescentes en la cámara de reacción pueden después ser visibles para el fotodetector a través de la abertura 557.

Cabezal detector

La Figura 5 muestra una sección transversal del cabezal detector 700 tomada a lo largo de la línea 13 de la Figura 4B. El cabezal detector 700 puede configurarse para excitar ópticamente y/o controlar la fluorescencia emitida en relación con la detección de uno o más polinucleótidos presentes en las cámaras de reacción 1703. Tenga en cuenta que un resultado positivo (presencia de un amplicón objetivo) puede indicarse por un aumento de la fluorescencia o una disminución de la fluorescencia, en dependencia del diseño del ensayo. Por ejemplo, cuando el ensayo involucra un fluoróforo y un inhibidor, el inhibidor puede inhibir la fluorescencia cuando el objetivo está presente, o en otros diseños de análisis, 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, tales como el par detector 726. Cada par de detectores 726 puede estar compuesto de una fuente de luz 726a, tales como un diodo emisor de luz (LED), y un detector de luz correspondiente 726b, como un fotodiodo. La fuente de luz 726a puede emitir luz selectivamente en una banda de absorción de una sonda fluorescente. El detector de luz 726b puede detectar

selectivamente la luz en una banda de emisión de la sonda fluorescente, en la que la sonda fluorescente corresponde a una sonda polinucleotídica o un fragmento de esta. En ciertas realizaciones, la fuente de luz 726a puede comprender un diodo filtrado de paso de banda que emite luz selectivamente en la banda de absorción de la sonda fluorescente. El detector de luz 726b puede comprender un fotodiodo filtrado de paso de banda que detecta selectivamente la luz en la banda de emisión de una porción fluorescente, por ejemplo, la emisión de una sonda fluorescente. En ciertas realizaciones, un filtro 726a1, tal como un filtro de paso de banda, puede aplicarse 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 microfluídico (300 μm de profundidad en ciertas realizaciones). En ciertas realizaciones, la longitud del trayecto óptico para la luz desde la cámara de reacción al detector de luz 726b puede ser muy pequeña. La luz incidente de la fuente de luz 726a genera fluorescencia en la cámara de reacción. La luz de la cámara de reacción luego viaja al detector de luz 726b. Ciertas realizaciones buscan mitigar que cualquier luz no deseada ingrese al detector y, de este modo afecte negativamente la señal de luz de la cámara de reacción.

En algunas realizaciones, cada una de la pluralidad de pares de detectores pueden estar dispuestos a lo largo del cabezal detector 700 en filas. Es decir, detrás de los pares 726 y 727 ilustrados en la Figura 5 puede estar otra columna de pares en una orientación similar o igual. En aras de la explicación, una colección de cartuchos o pares de detectores a lo largo del cartucho se denominan "fila" y aquellos a lo largo del ancho como "columna". De este modo, 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 detectores en total (dos filas de seis) con dos pares de detectores por columna, permitiendo 12 detecciones separadas y simultáneas.

Cada fuente de luz, tal como por ejemplo la fuente de luz 726a, puede configurarse para producir luz de una longitud de onda específica para una porción fluorescente específica asociada con, por ejemplo, una sonda, contenida en las cámaras de reacción. Cada detector de luz, tal como por ejemplo 726b, puede configurarse para detectar la luz emitida por las sondas fluorescentes asociadas con la luz producida por el emisor de luz en el par detector. Los pares detectores pueden configurarse para detectar independientemente una pluralidad de porciones 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 de este. Aunque pueden usarse trayectorias de luz plegadas, una realización utiliza un par detector y emisor donde cada uno está en contacto óptico directo con la cámara de reacción, preferentemente simultáneamente 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, preferentemente entre aproximadamente 8 y 60 grados, con mayor preferencia entre aproximadamente 10 y 50 grados.

En algunas realizaciones, el cabezal detector incluye dos filas de pares fotodetectores y fuentes de luz que corresponden a dos filas de cámaras de reacción de cartuchos microfluídicos, cuando están presentes en el aparato. Por ejemplo, el cabezal detector puede incluir una primera fila o superior de seis pares fotodetectores y fuentes de luz, y una segunda fila o inferior de pares fotodetectores y fuentes de luz, que están configurados para consultar la primera y segunda fila de cámaras de reacción dentro de un cartucho microfluídico, respectivamente.

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

Tabla 1

Color (especificaciones)	Colorante (ensayo)	Nombre de longitud de onda (excitación/emisión)	Software	CT#
Verde	FAM	470/510	FAM	4
Amarillo	TET, VIC	530/555	VIC	6
Naranja	Texas Red, ROX	585/610	Cal Red/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 los fotodetectores y las fuentes de luz representadas en la Figura 6 puede inhibir el diálogo cruzado entre las columnas de detección. Es decir, el intervalo de longitud de onda para cada par emisor detector puede seleccionarse para tener una superposición mínima con sus pares emisor detector vecinos. De este modo, por ejemplo, cuando el CT# se refiere a la columna de un par particular emisor detector 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 la emisión adyacente las longitudes de onda no son adyacentes entre sí en el cabezal detector. Que el colorante de la fila HRM sea nulo simplemente indica que puede usarse una variedad de colorantes, no 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 emisoras de luz y detectores pueden sustituirse por las mostradas.

Los pares emisor de luz y fotodetector de cada columna pueden calibrarse mediante el uso de la placa normalizadora. Después de la calibración, el cabezal detector puede moverse a una posición tal que una primera columna de pares emisor de luz y fotodetector se ubiquen sobre un primer grupo de carriles de manera que cada par emisor de luz y fotodetector tenga acceso a una cámara de reacción de los carriles. La detección de las cámaras de reacción en el primer grupo de carriles se realizará mediante el uso de la primera columna de emisores/detectores. Después, el cabezal detector puede moverse a una segunda posición de modo que la primera columna esté sobre un segundo grupo de carriles y la segunda columna esté sobre el primer grupo de carriles. La detección de las cámaras de reacción en el segundo grupo de carriles se realizará mediante el uso de la primera columna de emisores/detectores y la detección de las cámaras de reacción en el primer grupo de carriles se realizará mediante el uso de la segunda columna de emisores/detectores. El proceso puede continuar hasta que cada columna haya pasado por cada carril. De este modo, para N columnas de detectores y M columnas de cámaras, el detector realizará detecciones de 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 necesitaría moverse entre al menos 17 posiciones (18 si se considera la posición de calibración).

La Figura 7 muestra los resultados finales después de la operación de ciertos ejemplos. Se trazan los niveles fluorescentes detectados para cada par emisor de luz fotodetector 801-805 a lo largo del tiempo para una única cámara de reacción (o reactor) asociada con un solo carril. Después de un número suficiente de iteraciones (aproximadamente 30 en este ejemplo) del protocolo de hibridación y desnaturalización, los detectores identifican niveles crecientes de fluorescencia dentro del reactor.

Placa de la cámara

Ciertas de las realizaciones presentes se refieren al revestimiento que rodea e incluye la capa de la cámara. Particularmente, ciertas realizaciones contemplan la fabricación de una capa de abertura que comprende características que facilitan ventajosamente resultados consistentes a través de ensayos del módulo calentamiento/detección, como se discute en mayor detalle a continuación.

La Figura 8 ilustra la disposición de las placas encontrada en ciertas realizaciones del módulo óptico del termociclador de barrido y la bandeja receptora y el cartucho asociados. Cuando el cartucho se acerca a la capa de abertura 540 del módulo óptico 500a, la capa térmica 600, la capa de cámara 200 (que puede comprender un sustrato de la cámara), y la capa de abertura 540 pueden situarse como se representa en la realización de la Figura 8. Como se discutió anteriormente, la capa de cámara 200 puede comprender una pluralidad de cámaras de reacción 1703a-d, que pueden ubicarse de manera que se controlen térmicamente por separado una de otra, o en grupos. La capa térmica 600 puede comprender una pluralidad de unidades térmicas 1605a, 1605b, 1605c. La Figura 8 es un diagrama abstracto, simplificado de la descripción anterior, y no se muestran ciertas características de la vía microfluídica. En ciertas realizaciones, las unidades térmicas pueden estar desconectadas tanto mecánicamente como térmicamente una con la otra (como se ilustra por su separación física en la Figura 4). Sin embargo, en otras realizaciones, las unidades térmicas pueden colocarse cada una dentro de un mismo material de sustrato, pero espaciadas de modo que permanezcan desconectadas térmicamente, como se discutió anteriormente. De este modo, es posible que las unidades térmicas se separen térmicamente, pero no mecánicamente.

De esta manera, cada unidad térmica puede asociarse con una o más cámaras de reacción 1703a-d, por separado de las cámaras de reacción restantes. De acuerdo con el protocolo específico para cada cámara de reacción, las unidades térmicas pueden calentar y/o enfriar sucesivamente su cámara correspondiente adecuadamente. Por ejemplo, la unidad térmica 1605c puede enfriar y/o calentar la cámara 1703a de modo que la temperatura de la cámara 1703a sea sustancialmente independiente del estado de enfriamiento y térmico de la cámara 1703a. Aunque el calentamiento puede lograrse haciendo pasar corriente a través de un circuito microfluídico o electrónico, el enfriamiento puede ser "pasivo" en el sentido de que la convección solo entre la cámara microfluidica y se usa para reducir la temperatura de la cámara. Las unidades térmicas 1605a, 1605b, 1605c pueden controlarse mediante el uso de un sistema de control de bucle cerrado.

En algunas realizaciones, la placa de aberturas 540 puede ubicarse sobre la capa de la cámara 200 y puede proporcionar presión a la capa de la cámara 200 para facilitar el calentamiento y enfriamiento del cartucho microfluídico, por ejemplo, la capa de la cámara, por la capa térmica 600. La placa de aberturas puede incluir una pluralidad de aberturas 557a-d para facilitar la observación de cada fotodetector 726b de una cámara de reacción individual 1703a-d. En ausencia de la placa de aberturas 540, y en dependencia de la configuración de la capa térmica 600 y la capa de cámara 200, la capa de la cámara 200 puede "deformarse" y/o ser lo suficientemente flexible como para que la comunicación térmica entre las cámaras y las unidades térmicas respectivas sea inconsistente. El calentamiento y enfriamiento inconsistentes pueden conducir a una ejecución menos precisa de los protocolos y a resultados menos precisos. Como se describió anteriormente, la deformación significativa puede restringir el cabezal óptica del movimiento lateral. De este modo, el grosor de la placa de aberturas debe seleccionarse adecuadamente para facilitar una trayectoria de luz adecuada entre cada cámara de reacción y las fuentes de luz y fotodetectores, mientras que se garantiza un calentamiento y enfriamiento adecuados de la capa de la cámara. Si la capa de abertura es demasiado gruesa, la distancia desde el fotodetector 726b a la cámara puede ser demasiado grande, atenuando indeseablemente la lectura de la fluorescencia de 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 ejercerá demasiada presión sobre la cámara de reacción, haciendo que la convección sea demasiado grande. Por el contrario, si la capa de abertura 540 es demasiado delgada, puede que no evite que la capa de la cámara 200 se doble y deforme, y la capa de abertura 540 puede doblarse y deformarse. La deformación de las aberturas 557a-d o las cámaras 1703a-d puede desviar la luz de la fuente de luz 726a y evitar lecturas precisas por el fotodetector 726b.

Como consecuencia, las realizaciones descritas en la presente memoria 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, densidad y resistencia a la deflexión apropiadas deseadas para la operación. Además, el acero puede proporcionar baja autofluorescencia y, por lo tanto, es menos probable que afecte negativamente a la lectura del fotodetector 726b. El acero puede tratarse además electroquímicamente para disminuir su autofluorescencia y, de este modo, es menos probable que afecte negativamente la lectura del fotodetector. En ciertas realizaciones, la capa de abertura puede comprender níquel negro (Ni), es decir, Ni con un colorante añadido para reducir la autofluorescencia. 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 asegura por los paneles de soporte contiguos 500, 506 y 546, proporciona la resistencia apropiada. El aluminio puede chaparse electroquímicamente con un acabado de óxido anódico, por ejemplo, con un colorante negro añadido para reducir la autofluorescencia.

La óptica de iluminación puede diseñarse de modo que la luz de excitación que cae sobre la cámara de reacción, o reactor, incida 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 puede además ser largo y estrecho, es decir, extendido también. De este modo, la forma de las aberturas 557a-d puede diseñarse teniendo en cuenta tanto las dimensiones de la cámara de reacción debajo, como las posiciones relativas del emisor de luz y el fotodetector correspondientes. La longitud del punto puede ajustarse alterando varios factores, que incluyen: el diámetro del orificio donde se coloca el fotodetector 726b (el tubo que sostiene el filtro y la lente puede tener un efecto de abertura); la distancia del fotodetector 726b desde el reactor del PCR; y el uso de la lente adecuada en el fotodetector 726b.

Miembro de fuerza

En ciertas realizaciones, la bandeja receptora 520 coloca la capa de cámara 200 cerca de la capa térmica 600 o la capa de abertura 540, pero no se acopla mecánicamente y/o de este modo coloca las capas en contacto una con la otra. 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 receptora 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 miembros de fuerza (no mostrados) que están configurados para aplicar presión a la bandeja receptora 520 para acoplar térmicamente las fuentes de calor al cartucho microfluídico 200 colocado en la bandeja receptora 520. La aplicación de presión puede ser importante para garantizar un contacto térmico consistente entre el sustrato calentador y las cámaras de reacción, compuertas y válvulas, etc., en el cartucho microfluídico 200. Cuando la bandeja receptora 520 está en una posición cerrada, de este modo se coloca debajo de la placa de aberturas 540 del módulo óptico 502, el miembro de fuerza, tal como un conjunto de motor, debajo de la bandeja receptora 520

5 puede comenzar a viajar hacia el módulo óptico 502, llevando de este modo la bandeja receptora 520 más cerca del módulo óptico 502. A medida que la bandeja receptora 520 se desplaza hacia arriba hacia el módulo óptico 502, el cartucho 200 puede comenzar a entrar en contacto con una superficie inferior de la placa de aberturas 540. El cartucho 200 puede continuar viajando hacia arriba hasta que se reciba suficiente presión sobre el cartucho 200. Como se
 10 discutió anteriormente, la placa de aberturas 540 puede aplicar una presión igual en todos los puntos de la parte superior del cartucho 200 y, de este modo, presiona el cartucho 200 contra el sustrato calentador 600 con una presión uniforme. Como se discutió, la capa de abertura puede seleccionarse para poseer propiedades que faciliten esta
 15 operación. Por ejemplo, la selección del material de la placa de aberturas 540 puede proporcionar muy poca desviación del cartucho 200, cuando se presiona contra él.

20 La aplicación de presión uniforme del cartucho 200 contra el sustrato calentador 600 puede permitir un calentamiento uniforme para cada uno de los componentes del cartucho cuando se desee. Aunque puede obtenerse una presión y un contacto uniformes entre los calentadores en el sustrato calentador 600 y los componentes (válvulas, compuertas, cámaras, etc.) de las redes microfluídicas en el cartucho 200, los calentadores no se activan necesariamente
 25 simultáneamente, como se discutió anteriormente. En ciertas realizaciones, la aplicación de presión uniforme no necesariamente resulta en un calentamiento igual de diferentes componentes del cartucho 200. En algunas realizaciones, tanto la activación de un calentador específico en el sustrato calentador 600 como la presión aplicada por la placa de aberturas 540 al cartucho 200 activan un componente particular del cartucho 200.

30 Las Figuras 9A-H son diagramas de las dimensiones de una posible realización de la placa de aberturas. En esta realización, puede aplicarse un revestimiento de conversión química para ajustar las propiedades reflectantes de la capa de abertura. Algunas porciones 9002 pueden seleccionarse para no recibir el revestimiento de conversión química. El revestimiento puede aplicarse a la superficie de la placa 540 o depositarse en todo su material. En algunas realizaciones, el material de la placa 540 puede comprender acero. En otras realizaciones, la placa 540 puede comprender aluminio. Aún en 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, que incluyen, por ejemplo, aluminio, níquel o acero.

35 En la realización mostrada en las Figuras 9A-H, las dimensiones de la placa se han seleccionado para cumplir con las restricciones con respecto a la presión de la cámara y la trayectoria óptica a los pares detectores discutidos anteriormente. El grosor del material de la placa 540 comienza en 0,78750 cm (0,3125 pulgadas) y se procesa hasta el grosor deseado. Como se indicó, gran parte de la placa comprende un grosor de aproximadamente 0,63 cm (0,25 pulgadas). Sin embargo, este grosor puede variar, por ejemplo, el grosor sobre las aberturas de apertura 557 puede ser de 0,48 cm (0,19 pulgadas). Como se discutió anteriormente, el grosor de la abertura de la apertura facilita una trayectoria óptica sin obstáculos entre el fotodetector y la fuente de luz a los contenidos de la cámara de reacción.

40 Genéricamente, las dimensiones de la placa de aberturas 540 se seleccionan de manera que en combinación con las propiedades de los materiales que constituyen la placa de aberturas 540, la placa 540 proporciona presión suficiente a la placa de la cámara subyacente para facilitar el calentamiento y enfriamiento adecuados, así como la rigidez suficiente para evitar deformaciones de la placa de la cámara. Dicha deformación puede resultar en 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 deberían imponer una distancia desfavorable desde la cámara de reacción de la capa de la cámara al par fuente de luz y fotodetector a través de las aberturas 557. Las dimensiones 540 de la placa de aberturas tampoco deben obstruir la trayectoria óptica desde el par fuente de luz y fotodetector hasta el contenido del reactor de la cámara.

45 En algunas realizaciones, la placa normalizadora 546 puede unirse a la placa de aberturas insertando tornillos en las posiciones 9001 u otros medios 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 con respecto a las aberturas restantes.

50 La Figura 10 ilustra diversas dimensiones de las perspectivas de la placa de aberturas de las Figuras 9A-H. Como se discutió anteriormente, en esta realización, puede aplicarse primero un revestimiento de conversión química para evitar que los materiales base, por ejemplo, aluminio, níquel o acero, se oxiden mientras que se proporciona una conexión a tierra eléctrica mejorada para una operación electrónica adecuada. Solo las superficies que pueden estar expuestas a la operación óptica se recubren después selectivamente con anodización negra.

Consistencia del análisis de diagnóstico

60 En la presente memoria se divulgan además procedimientos para garantizar análisis de diagnóstico consistentes en los ensayos dentro del mismo calentador/detector y en diferentes calentadores/detectores. Particularmente, se divulgan ejemplos de un sistema y proceso para determinar la duración y las compensaciones para una pluralidad de protocolos de PCR para sincronizar la detección entre ellos. Además, se discuten los procedimientos para ajustar el tiempo de enfriamiento del reactor para garantizar resultados más consistentes.

65 La Figura 11 es un perfil de temperatura para una cámara de reacción sometida a un protocolo particular 2000. Como se ilustra anteriormente, el sistema en funcionamiento 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 idénticos de calentamiento/enfriamiento, donde cada ciclo comprende mesetas desnaturalizantes 2000B y mesetas de hibridación 2000D donde la temperatura se mantiene constante durante un período de tiempo. Estos ciclos pueden estar precedidos por un ciclo no periódico del protocolo, tal como un período de incubación. En ciertos ejemplos, el protocolo puede especificarse como una colección de temperaturas y períodos de tiempo. Es decir, el protocolo puede especificar inicialmente solo que la cámara se mantendrá a 95 °C durante la duración B y después a 61 °C durante la duración D. Ciertos ejemplos contemplan agrupar estos segmentos en "etapas" y "subetapas" para facilitar al usuario y el control 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 denominarse "subetapas". En ciertas realizaciones, un usuario puede especificar las duraciones de las subetapas. En otros ejemplos, estas duraciones pueden recuperarse de una base de datos. Típicamente, estos tiempos se establecen a partir de un protocolo estándar o por entrada del usuario, a veces mediante el uso de una "receta" establecida de temperaturas y tiempos de meseta. Además de estas subetapas, el perfil de temperatura del protocolo comprenderá además transiciones, tales 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 la naturaleza de los elementos de calentamiento empleados.

En ciertas divulgaciones adicionales, la trayectoria térmica tanto para calentamiento como para el enfriamiento puede determinarse para la totalidad de la reacción antes del inicio de la ejecución. En algunos sistemas, el contorno de la temperatura frente al tiempo se controla y ajusta a lo largo de la reacción para minimizar las temperaturas de transición, y teniendo en cuenta las variaciones en la eficiencia 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 temperatura puede variar de un ciclo a otro. Tales ajustes pueden resultar en diferentes tiempos de reacciones generales, y, más importante, diferentes eficiencias de reacciones generales. Como consecuencia, en algunos ejemplos, los sistemas y procedimientos descritos en la presente memoria proporcionan ventajosamente sistemas en los que el contorno de la relación de temperatura frente al tiempo de la reacción completa para cada cámara de reacción independiente (o grupo de cámaras) se establece de forma predeterminada antes del inicio de la ejecución. Esto no solo permite ventajosamente la sincronización de las etapas de detección múltiples en una pluralidad de reactores diferentes, sino que permite además un control más estricto sobre los parámetros que minimizan las diferencias en la eficiencia de la reacción que puede surgir como resultado de diferentes contornos de temperatura/tiempo. En algunos ejemplos, los sistemas y procedimientos proporcionados en la presente memoria proporcionan el informe de errores al final de una reacción si la temperatura medida es diferente del valor esperado cuando se completa una ejecución.

En diversos puntos en el perfil de temperatura del protocolo 2000, el usuario o la receta pueden especificar que ocurra una detección. Por ejemplo, para algunos protocolos puede solicitarse una detección al final del segmento 2000D. Si las detecciones se especificaran arbitrariamente en cada protocolo, el cabezal detector tendría que desplazarse entre las posiciones de manera ineficiente e incluso podría resultar imposible realizar detecciones en los momentos solicitados. Es decir, si cada una de una pluralidad de protocolos se iniciara simultáneamente y se ejecutara en paralelo simultáneamente a través de cada una de las cámaras de reacción en el cartucho, sería muy ineficiente que el detector cumpliera con las solicitudes de detección de cada protocolo. Particularmente, una vez que se completa la calibración, el detector necesitaría viajar primero a posiciones adecuadas para realizar detecciones para cada par de fuente luz detector en su matriz para el primer perfil. Sin embargo, cuando el detector termine, cada uno de los protocolos restantes entrará en un período en el que no se realizará la detección. Por lo tanto, habrá un período de "tiempo muerto" cuando el detector no pueda realizar ninguna detección y, en su lugar, simplemente debe permanecer inactivo esperando la oportunidad de realizar la próxima detección. Este "tiempo muerto" es ineficiente y prolonga innecesariamente el proceso de diagnóstico. Además, cuando se van a realizar detecciones sucesivas, el "tiempo muerto" puede generar detecciones irregulares y aperiódicas de la misma cámara, posiblemente introduciendo lecturas inconsistentes.

Determinados ejemplos presentes contemplan ajustes automatizados a paciones del perfil 2000 para facilitar la detección eficiente en múltiples protocolos. Esto puede lograrse permitiendo que el usuario edite, o el sistema pueda editar automáticamente, la longitud del segmento 2000B o 2000D.

Debe entenderse que, siempre que se produzca al menos un tiempo mínimo de meseta, puede acomodarse alguna extensión menor de los tiempos de meseta en la mayoría de los protocolos de amplificación. Esta flexibilidad se utiliza para todas las adaptaciones eficientes de diferentes ensayos que se realizan simultáneamente, mientras se realiza un monitoreo en tiempo real de la amplificación mediante la lectura de diversos ensayos mediante el uso de un cabezal detector de barrido.

Si la detección se realizara durante el segmento 2000B, por ejemplo, el sistema o el usuario pueden extender la duración del segmento 2000B como sea necesario para acomodar el movimiento del cabezal detector y coordinar la lectura de una pluralidad de ensayos que se realizan simultáneamente. La duración de los segmentos 2000A y 2000C puede calcularse mediante el uso de una velocidad de enfriamiento estándar predeterminada de las temperaturas anteriores e incorporarse al análisis. Algunos ejemplos no permiten al usuario editar estos segmentos y, en su lugar, el sistema los tiene en cuenta internamente.

En ciertas divulgaciones adicionales, los ajustes de protocolo determinados por el sistema pueden comprender al menos tres formas separadas. El primer ajuste puede comprender un "ajuste intraciclo" en el que las mesetas tales como 2000B y 2000D del protocolo se extienden de modo que todo el ciclo de etapas 2000A-D alcance la 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 se completa el ajuste intraciclo, el sistema puede realizar después un "ajuste entre ciclos". Un ajuste entre ciclos puede asegurar que los eventos de detección dentro de cada ciclo ocurran en múltiplos enteros de una duración deseada, separados uno del otro (tales como un múltiplo entero del tiempo del ciclo de detección) entre los ciclos. Estos ajustes se discuten con respecto a la Figura 14. El tercer ajuste puede comprender un "ajuste de compensación inicial" que puede depender solo del carril usado para la ejecución del protocolo. Estos ajustes se discuten con respecto a las Figuras 15A-C.

Revisión general del ajuste del protocolo

La Figura 12 representa un diagrama de flujo de un proceso 4000 usado en algunos de los ejemplos divulgados para determinar una solución apropiada para los tiempos de detección del detector y los perfiles del protocolo. El proceso 4000 puede implementarse en el programa, en el equipo o en una combinación de firmware de los dos. Por ejemplo, el proceso puede implementarse en cualquiera de un FPGA, un microcontrolador o programa que se ejecuta en un procesador de computadora. Las porciones del proceso pueden realizarse por un procesador de propósito general, tal como un microcontrolador, mientras que otras porciones pueden realizarse en el equipo, en el programa o sistemas de firmware dedicados. El proceso comienza 4001 mediante la determinación de un tiempo de ciclo de detección (o mediante el uso de un tiempo de ciclo de detección predeterminado, por ejemplo, ya en memoria) para el sistema 4002. El tiempo del 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 emisor/detector en un cabezal de detección en cada una de las seis columnas de la Figura 6), realice todas las detecciones necesarias, y regrese a una posición inicial. Opcionalmente, puede permitirse que el usuario o el sistema realice ajustes en el procedimiento de detección para modificar el tiempo del ciclo de detección. Por ejemplo, el usuario puede desear realizar solamente la detección mediante el uso de un subconjunto de detectores. En algunos ejemplos, el tiempo del ciclo de detección es de aproximadamente 10 segundos, cuando el ejemplo comprende seis columnas de pares de detectores y se usan las seis columnas.

Se divulga adicionalmente que el proceso puede determinar primero una pluralidad de "ajustes intraciclo" para uno o más de los protocolos 4003. Como se discute a continuación con respecto a la Figura 13, las duraciones para una etapa o subetapa pueden comprender el tiempo para realizar una etapa o subetapa particular dentro del protocolo. Los tiempos de ciclo pueden determinarse mediante una combinación de especificaciones del usuario y restricciones identificadas por el sistema. En ciertos ejemplos, el sistema requerirá que la pluralidad de tiempos de ciclo sean múltiplos enteros del tiempo de ciclo de detección. Pueden introducirse "ajustes intraciclo" para satisfacer esta restricción. Por ejemplo, si el tiempo del ciclo de detección fue de 12,2 segundos, los tiempos de ciclo para una etapa del protocolo pueden ser 22,4, 33,6, 44,8 o cualquier otro $N * 12,2$ duración, donde N es un número entero mayor que 0. En algunos ejemplos, solo es necesario imponer esta restricción cuando se va a realizar una detección dentro del ciclo.

De este modo, los ajustes intraciclo aseguran que el ciclo del protocolo sea un múltiplo entero del tiempo del ciclo de detección. Sin embargo, puede solicitarse una detección en cualquier punto dentro de un ciclo. Si el tiempo del ciclo de detección es de 10 segundos, entonces lo más temprano que puede realizarse una detección es a los 10 segundos después de que se inicia el protocolo. Las detecciones pueden realizarse en múltiplos enteros después de ese tiempo (20, 30, 40 segundos, etc.).

De este modo, puede determinarse un ajuste adicional, un ajuste "entre ciclos" 4004, para asegurar que la detección solicitada se produzca en el momento apropiado. Estos "ajustes entre ciclos" pueden incorporarse al protocolo como retrasos adicionales entre las etapas o subetapas del protocolo. Dicho de otra manera, un protocolo de PCR una vez sometido a ajustes "intraciclo" puede comprender etapas de ciclo "válidas". El protocolo de PCR puede generarse encadenando cada una de las etapas y añadiendo transiciones de etapa a etapa. Los "ajustes entre ciclos" 4004 aseguran que los tiempos de detección ocurran en los múltiplos enteros deseados del tiempo del ciclo de detección después de que los ciclos se hayan encadenado.

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 (quizás después de un ajuste "intraciclo"). De este modo, mientras que el tiempo del ciclo en su conjunto está correctamente alineado con el tiempo del ciclo de detección de 10 segundos ($3 * 10 = 30$ segundos), la primera detección en sí misma no está correctamente alineada con la detección (18 segundos no es un múltiplo de 10 segundos). El sistema agregará 2 segundos de ajuste "entre ciclos" a la primera ejecución de detección para que la primera detección ocurra 20 segundos después del inicio del protocolo. Esto puede hacerse extendiendo la temperatura de mantenimiento final de la etapa anterior durante 2 segundos adicionales mediante un "ajuste de relleno". Si no hay una etapa anterior, el sistema insertará un mantenimiento de 2 segundos a temperatura ambiente al comienzo de la primera ejecución del ciclo. De este modo, si el sistema comienza a funcionar en T_0 , la primera detección ocurrirá en $T_0 + 20$ segundos, la segunda detección en $T_0 + 50$ segundos, etc.

Debido a los ajustes inter e intraciclo, el protocolo está en una forma tal que las detecciones solo se solicitarán en momentos convenientes para que el cabezal detector se mueva a la cámara de reacción que realiza el protocolo. Todos los protocolos se realizaron en cámaras de reacción ubicadas en la primera columna del cartucho (y un número suficiente de detectores presentes en el cabezal detector), solo los ajustes intra y entre ciclos serían suficientes para modificar adecuadamente el protocolo para una detección eficiente (aquí se hace referencia a una primera columna a una columna de carriles tales como los carriles 1706a y 1706b con las cámaras asociadas 1703a y 1703b en la Figura 3A). Sin embargo, debido a que los protocolos operan en diferentes columnas del cartucho, es necesario compensar además la iniciación del protocolo para compensar el retraso del cabezal detector en alcanzar la ubicación de la cámara.

De este modo, se agregan "compensaciones de ajuste de inicio" al protocolo en base a la ubicación de la cámara en la que se realiza el protocolo. Estas "compensaciones de ajuste inicial" 4005 se describen con mayor detalle con respecto a las Figuras 15A-C. En algunos ejemplos, estos ajustes se realizan en tiempo de ejecución y se basan únicamente en la ubicación del carril de ejecución. Por ejemplo, puede que no sea necesario un ajuste para un protocolo que se ejecuta en carriles ubicados en una primera columna de la cámara, por lo que un protocolo que se ejecute en las cámaras de estos carriles tendrá un tiempo de inicio retrasado de +0 segundos. Cada columna de carriles posterior gana un retraso de 400 milisegundos por su distancia desde la primera columna, debido al tiempo requerido para las detecciones (dos detecciones a 100 milisegundos cada una, realizadas asincrónicamente en este ejemplo) 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 a los 10 segundos, la columna 2 tiene su primera detección a los 10,4 segundos, la columna 3 tiene su primera detección a los 10,8 segundos, etc. Al retrasar el inicio de un protocolo correctamente alineado en el tiempo necesario para un carril particular, puede mantenerse la alineación esperada. Mientras que este ejemplo particular supone que el protocolo ya está alineado (de los ajustes 4003 y 4004), el experto en la técnica apreciará fácilmente que otros ejemplos pueden determinar las compensaciones que anticipan ajustes futuros.

Aunque se describe en el orden de las etapas 4003, 4005 y 4004, se reconocerá fácilmente que estas etapas pueden organizarse en cualquier otro orden adecuado, y tampoco es necesario que el sistema realice cada etapa sucesivamente. Sin embargo, en algunos ejemplos, tales como los descritos anteriormente, puede ser necesario realizar ajustes entre ciclos después de realizar ajustes intraciclo, ya que el ajuste entre ciclos depende de la modificación intraciclo. A diferencia, el ajuste de compensación inicial 4005 puede no depender de ninguna determinación previa. Es decir, en algunos ejemplos, la compensación inicial 4005 necesita determinarse solo una vez en el tiempo de ejecución, mientras que los ajustes intraciclo 4003 y los ajustes entre ciclos 4004 pueden realizarse para cada etapa de ciclo en los protocolos.

En algunos ejemplos, una vez que los tiempos de protocolo se han ajustado correctamente, el proceso puede iniciar los protocolos 4006. En algunos ejemplos, un procesador puede simplemente colocar las compensaciones en una ubicación de memoria para su recuperación por un componente dedicado separado del sistema que inicia cada protocolo.

Ajustes intra ciclos

Los "ajustes intra ciclos" comprenden ajustes a intervalos de etapa o subetapa, como puede haberse especificado por un usuario o recibido de 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 ciertos ejemplos, el usuario puede especificar ciertas características del perfil del protocolo, tales como los tiempos deseados para una subetapa del protocolo, mediante el uso de una interfaz de usuario, o una interfaz de usuario gráfica (GUI). En algunos ejemplos, el sistema puede validar la selección del usuario. Después de calcular las longitudes del segmento para cada una de las subetapas, el programa del sistema validará el tiempo del ciclo de la etapa e indicará si es necesario realizar algún ajuste. En algunos ejemplos, un tiempo de ciclo de etapa "válido" es un tiempo de ciclo de etapa que es un múltiplo entero del tiempo del ciclo de detección. Si un tiempo del ciclo de la etapa no es válido, puede solicitarse al usuario que haga ajustes para esa etapa 5003b. Si no es necesario el ajuste, puede notificarse al usuario 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 sola subetapa de 900 segundos. El usuario ha solicitado que la etapa 5001 ocurra 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 realice ninguna detección y, como consecuencia, la etapa es válida, ya que la etapa no requerirá que se ajuste la posición del cabezal detector. Cuando no se solicita la detección, el sistema registra los intervalos de tiempo solicitados, para futuras consideraciones de compensación, pero no puede imponer ninguna restricción de que el intervalo de tiempo sea un múltiplo del tiempo de detección (aunque la duración puede considerarse para determinar un ajuste posterior entre ciclos). Sin embargo, si en este ejemplo el usuario hubiera solicitado la detección durante esta etapa, la etapa seguiría siendo 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 el ejemplo ilustrado, el sistema ha determinado que esta entrada de etapa es válida.

En el ejemplo ilustrado en la Figura 13, la etapa PCR 5002 comprende dos subetapas, una primera subetapa donde la cámara se mantendrá a 95 °C y otra subetapa donde la cámara se mantendrá a 61 °C. El usuario ha solicitado que se realicen 45 ciclos de esta etapa 5011. El usuario ha solicitado que la primera subetapa dure 2 segundos y que la segunda subetapa dure 10,2 segundos para un total de 12,2 segundos. Como se discutió anteriormente con respecto a la Figura 7, el sistema puede haber calculado además el tiempo de transición de 95 °C a 61 °C y agregar esta duración a las solicitudes del usuario. En este ejemplo, el calentamiento de 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 en base a las entradas del usuario. Finalmente, en algunos ejemplos, cuando se solicita una detección para una subetapa 5004, como lo solicitó el usuario aquí, el sistema agrega un retraso adicional al tiempo de mantenimiento para esa subetapa. En este ejemplo, ese retraso es de 2,2 segundos, lo que explica el tiempo mínimo requerido para permitir que el detector se mueva y detecte con cada una de las seis columnas de pares emisor de luz-fotodetector en el cabezal 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).

De este modo, la duración total de la etapa en su conjunto es:

$$4,25 \text{ (calentamiento)} + 2,0 \text{ (desnaturalización)} + 7,05 \text{ (enfriamiento)} + 10,2 \text{ (hibridación)} + 2,2 \text{ (detección)} =$$

25,7 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 puede eliminar 5,7 segundos de la duración de la etapa o agregar 4,3 segundos adicionales para lograr un múltiplo del tiempo del ciclo de detección (es decir, un múltiplo de 10 segundos). Estos "ajustes de etapa intra ciclos" se incorporarán al protocolo después de la selección del usuario.

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

30 Ajustes entre ciclos

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

En algunos ejemplos divulgados adicionalmente, el ajuste 6005 se determina determinando primero el tiempo requerido para calentar o enfriar la temperatura desde el final de la etapa anterior hasta la temperatura de la primera subetapa de la siguiente etapa. Si es necesario algún tiempo adicional para la alineación, la temperatura desde el final de la etapa anterior puede mantenerse durante este tiempo. En la Figura 14 se muestra un ejemplo de alineación entre la temperatura final de una etapa de mantenimiento a 75 °C con la temperatura de la primera subetapa de 95 °C. La temperatura se eleva a 8 °C/s desde 75 °C a 95 °C desde los puntos 6001b a 6001c, con el tiempo restante requerido para la alineación se mantiene a 75 °C después del final de la etapa anterior, desde los puntos 6001a a 6001b. Este período puede denominarse como un "ajuste entre ciclos". Para lograr la continuidad de la alineación de la detección entre las etapas, puede ser necesario cambiar (o retrasar) el inicio de un ciclo de etapas después del final de la etapa anterior mediante este "ajuste entre ciclos". Puede calcularse después el tiempo requerido para calentar o enfriar la temperatura desde el final de la etapa anterior hasta la temperatura de la primera subetapa de la siguiente etapa. Si es necesario algún tiempo adicional para la alineación, la temperatura desde el final de la etapa anterior se mantiene durante el tiempo del "ajuste entre ciclos". En algunos ejemplos, el sistema puede tener en cuenta estas consideraciones cuando recibe la entrada del usuario a través de GUI 5000 e incorporarlas en la variación propuesta 5003b.

Inicio de ajustes de compensación

La Figura 15A ilustra los ciclos iniciales de dos perfiles del protocolo separados 3001 y 3005. En cada uno de estos protocolos, los ajustes inter e intraciclo pueden haberse realizado, pero la compensación 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 del tiempo 0 al tiempo 30). Un tiempo para la detección 3020a, o una solicitud de detección ocurre 30 segundos. Tenga en cuenta que de acuerdo con los ajustes entre ciclos discutidos anteriormente, puede haberse incluido un pequeño retraso en el protocolo 3001 justo antes de la primera elevación de calor para el alineamiento de la primera detección 3020a. Como se discutió anteriormente, los ajustes entre ciclos e intraciclo facilitan las solicitudes de detección que se realizan en múltiplos enteros del tiempo del ciclo de detección. 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 del 3001. El perfil 3005 comprende una etapa de inicialización que dura de 0 a 30 segundos. Al perfil 3005 le sigue una pluralidad de ciclos de 50 segundos, con la primera detección a los 40 segundos. Estos ciclos representan una PCR de 3 temperaturas, que incluye una desnaturalización a alta

temperatura, la hibridación y la detección a baja temperatura, y después una extensión a una temperatura media. Como antes, el primer ciclo de inicialización puede incluir un pequeño retraso entre ciclos al principio para el alineamiento. Se reconocerá que su retraso entre ciclos puede insertarse en una variedad de posiciones sobre el etapa de inicialización para garantizar el alineamiento de la detección.

La Figura 15B ilustra múltiples ejemplos de los dos protocolos de la Figura 15A. Si fue posible realizar detecciones en todos los carriles en todas las columnas de la cámara simultáneamente, los perfiles ilustrados en la Figura 15B serían adecuados. Sin embargo, debido al retraso de tiempo requerido para que el cabezal detector analice a través de una columna de cámara con cada una de sus columnas de pares detectores, es necesario compensar cada uno de los protocolos 3001-3007 en base a la ubicación de la cámara en la que se ejecutan. Por simplicidad, se supone que cada uno de los protocolos 3001-3007 se ejecuta en una columna vecina. Si el protocolo 3001 se ejecuta en la columna de la primera cámara, entonces 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 iniciales de desplazamiento" 3010-3015 introducidos para garantizar el alineamiento de la 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 para cada uno de los protocolos de ejecución. De este modo, el protocolo 3001 solicitará la detección, mediante el uso de la primera columna del cabezal detector en la solicitud 3020a. Cuando el cabezal detector se mueve para alinear la segunda columna del cabezal detector con la cámara del protocolo 3001, la primera columna del cabezal detector estará dispuesta sobre la cámara del 3002 que, ventajosamente, solicita además una detección 3021a. Posteriormente, el proceso continúa con la primera columna del cabezal detector que lee el protocolo 3003 en la solicitud 3022a, la segunda columna lee 3002 y la tercera lectura 3001. Se reconocerá que el sesgo ilustrado en la Figura 15C no está a escala (en algunos ejemplos, el sesgo puede ser del orden de ~400 milisegundos), y se ha ilustrado como se muestra solo con fines explicativos.

De este modo, con los "ajustes iniciales" correctamente seleccionados, el sistema puede garantizar tiempos de detección consistentes en cada uno de los reactores. Como se ilustra en la Figura 15C, se realizan detecciones ordenadas y eficientes a lo largo de las líneas 3007a-d cuando el sistema detector implementa la solución determinada. De este modo, la detección de un reactor particular ocurrirá al mismo tiempo de ciclo a ciclo. Los detalles de un ejemplo para determinar estas soluciones se describirán con mayor detalle con respecto a la Figura 16.

Enfriamiento activo

En ciertos ejemplos divulgados adicionalmente 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 pasivo, donde se usa solo convección para enfriar el contenido del reactor. Para proporcionar además una realización de diagnóstico consistente, ciertos de los ejemplos contemplan la participación activa en el proceso de enfriamiento del reactor para garantizar un comportamiento consistente. La Figura 16 ilustra un perfil térmico 7001 que comprende un componente de enfriamiento. El perfil 7001 comprende un tiempo de elevación 7006, una meseta 7005 y un período de enfriamiento 7002/7003.

La temperatura ambiente en el lugar donde se encuentra la unidad de calefacción/detección puede no ser la misma. Es decir, un sistema que opera en el sur de Arizona no puede estar sujeto a las mismas temperaturas ambientales que un sistema que opera en el norte de Alaska. De este modo, en la temperatura ambiente más alta en la que se espera que funcione el sistema, el perfil 7001 puede tener una curva de enfriamiento 7003. En un ambiente más frío, el perfil de enfriamiento 7002 puede resultar en su lugar. Para compensar la diferencia, ciertos ejemplos contemplan monitorear el perfil de enfriamiento del reactor a través de los sensores de temperatura, posiblemente aquellos discutidos con respecto a la Figura 3b. Cuando se detectan desviaciones del perfil máximo 7003, se puede aplicar suficiente calentamiento para que el perfil 7002 siga al perfil 7003. En algunos ejemplos, el calor puede aplicarse periódicamente a tiempos 7004a-c, mientras que el calor puede aplicarse continuamente en otros ejemplos. De esta manera, pueden lograrse perfiles consistentes independientemente de la ubicación geográfica del termociclador o la temperatura ambiente de funcionamiento.

Ciertos de estos ejemplos aplican la ley de enfriamiento de Newton para determinar cuándo aplicar los calentadores:

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

Dónde: T (t) es la temperatura en el tiempo t, T (0) es la temperatura inicial, T_a es el parámetro de temperatura ambiente, r es el parámetro constante de disminución y t es el tiempo. En algunos ejemplos, pueden usarse 50,2 grados Celsius y 0,098 como parámetro de temperatura ambiente y parámetro constante de disminución, respectivamente. En este ejemplo, el parámetro de temperatura ambiente se selecciona para que sea más alto que cualquier temperatura ambiente de funcionamiento esperada, de este modo permite un control total sobre el ciclo de enfriamiento mediante la aplicación de al menos una pequeña cantidad de calor durante cada ciclo de enfriamiento, independientemente de la temperatura ambiente, para hacer coincidir el enfriamiento real con la curva de enfriamiento del perfil máximo 7003 en cada caso.

Como se utiliza en la presente memoria, una "entrada" puede ser, por ejemplo, datos recibidos de un teclado, un rodillo, un ratón, un sistema de reconocimiento de voz u otro dispositivo capaz de transmitir información de un usuario a una computadora. El dispositivo de entrada puede ser además una pantalla táctil asociada con la pantalla, en cuyo caso el usuario responde a las indicaciones en la pantalla tocando la pantalla. El usuario puede ingresar información textual a través del dispositivo de entrada, tal como el teclado o la pantalla táctil.

La invención es operativa con muchos otros entornos o configuraciones de sistemas informáticos de propósito general o de propósito especial. Los ejemplos de sistemas informáticos conocidos, entornos y/o configuraciones que pueden ser adecuados para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, microcontroladores, computadoras personales, computadoras de servidor, dispositivos portátiles o de mano, sistemas multiprocesador, sistemas en base a microprocesador, electrónica de consumo programable, PC en red, minicomputadoras, computadoras mainframe, entornos informáticos distribuidos que incluyen cualquiera de los sistemas o dispositivos anteriores.

Como se utiliza en la presente memoria, las "instrucciones" se refieren a las etapas implementadas por computadora para procesar la información en el sistema. Las instrucciones pueden implementarse en el programa, firmware o equipo e incluir cualquier tipo de etapa programado realizado por los componentes del sistema.

Un "microprocesador" o "procesador" puede ser cualquier microprocesador convencional de uno o varios núcleos de uso general, tal como un procesador Pentium®, Intel® Core™, un procesador 8051, un procesador MIPS® o un procesador ALPHA®. Además, el microprocesador puede ser cualquier microprocesador convencional de propósito especial, tal como un procesador de señal digital o un procesador de gráficos. Un "procesador" puede referirse además, pero no se limita a, a microcontroladores, arreglos de compuertas programables de campo (FPGA), circuitos integrados específicos de aplicación (ASIC), dispositivos lógicos programables complejos (CPLD), arreglos lógicos programables (PLA), microprocesadores u otros dispositivos de procesamiento similares.

El sistema se compone de diversos módulos como se describe en detalle a continuación. Como puede apreciar un experto en la técnica, cada uno de los módulos comprende diversas subrutinas, procedimientos, declaraciones de definición y macros. Cada uno de los módulos se compila por separado típicamente y se vincula en un solo programa ejecutable. Por lo tanto, la siguiente descripción de cada uno de los módulos se usa por conveniencia para describir la funcionalidad del sistema preferente. De este modo, los procesos que experimenta cada uno de los módulos pueden redistribuirse arbitrariamente a uno de los otros módulos, combinarse en un solo módulo o ponerse a disposición, por ejemplo, en una biblioteca de enlaces dinámicos compartibles.

Ciertos ejemplos del sistema pueden usarse en conexión con diversos sistemas operativos tales como SNOW LEOPARD®, iOS®, LINUX, UNIX o MICROSOFT WINDOWS®, o cualquier otro sistema operativo adecuado.

Ciertos ejemplos del sistema pueden escribirse en cualquier lenguaje de programación convencional, tales como ensamblado, C, C++, BASIC, Pascal o Java, y ejecutarse bajo 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, tales como unidades FLASH, CD-ROM, discos duros y DVD. Un ejemplo incluye un dispositivo de almacenamiento programable que tiene instrucciones almacenadas en él.

Mientras que los procesos y procedimientos anteriores se describen anteriormente como que incluyen ciertas etapas y se describen en un orden particular, debe reconocerse que estos procesos y procedimientos pueden incluir etapas adicionales o pueden omitir algunos de las etapas descritas. Además, cada una de las etapas de los procesos no necesariamente debe realizarse en el orden en que se describen.

Las etapas de un procedimiento o algoritmo divulgado en relación con los ejemplos divulgados en la presente memoria pueden realizarse directamente en el equipo, en un módulo de programa ejecutado por un procesador o en una combinación de los dos. Un módulo de programas puede residir en la memoria RAM, memoria flash, memoria ROM, memoria EPROM, memoria EEPROM, registros, disco duro, un disco extraíble, un CD-ROM o cualquier otra forma de medio de almacenamiento conocido en la técnica. Puede acoplarse un medio de almacenamiento ejemplar al procesador de modo que el procesador pueda leer información 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. Como alternativa, el procesador y el medio de almacenamiento pueden residir como componentes discretos en un terminal de usuario.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato (10) para realizar la amplificación y la detección de ácidos nucleicos en tiempo real, que comprende:
un módulo óptico (502) que comprende:
- 5 un cabezal detector (700) montado en un riel alojado en el módulo óptico, comprendiendo el cabezal detector una pluralidad de pares de detectores (726), cada par de detectores tiene al menos una fuente de luz (726a) y al menos un detector de luz (726b);
una placa de aberturas (540) dispuesta en un lado inferior del módulo óptico, comprendiendo la placa de aberturas una pluralidad de aberturas (557), en la que el cabezal detector puede moverse a lo largo del riel para
10 colocar las fuentes de luz sobre las aberturas de la placa de aberturas; y
una bandeja receptora (520) unida al módulo óptico para recibir un cartucho microfluídico (200), comprendiendo el cartucho microfluídico una pluralidad de cámaras de reacción independientes, en el que la bandeja receptora coloca el cartucho microfluídico debajo del módulo óptico, de modo que cada una de la pluralidad de las cámaras de reacción está alineada con una abertura de la placa de aberturas, estando el aparato **caracterizado porque**
15 comprende además una placa normalizadora (546) configurada para calibrar los pares de detectores en el cabezal detector, comprendiendo la placa normalizadora uno o más componentes que tienen características ópticas estandarizadas conocidas, en el que la placa normalizadora se une al lado inferior de la placa de aberturas debajo al menos de una porción de la pluralidad de aberturas.
- 20 2. El aparato (10) de la reivindicación 1, en el que, cuando las fuentes de luz (726a) son colocadas sobre las aberturas (557), cada fuente de luz es configurada para emitir luz a través de una abertura a una cámara de reacción en el cartucho microfluídico (200).
3. El aparato (10) de la reivindicación 1, en el que la placa normalizadora (546) está unida a la placa de aberturas (540)
25 en el lado inferior del módulo óptico (502).
4. El aparato (10) de la reivindicación 1, en el que las fuentes de luz (726a) en el cabezal detector (700) emiten luces de diferentes longitudes de onda.
- 30 5. El aparato (10) de la reivindicación 4, en el que la placa normalizadora (546) incluye un cromóforo estandarizado para cada color emitido por el cabezal detector (700).
6. El aparato (10) de la reivindicación 4, en el que la placa normalizadora (546) incluye un fluoróforo estandarizado para cada color emitido por el cabezal detector (700).
35
7. El aparato (10) de la reivindicación 1, en el que la bandeja receptora (520) comprende uno o más calentadores en contacto térmico con las cámaras de reacción del cartucho microfluídico (200).
8. El aparato (10) de la reivindicación 7, en el que la placa de aberturas (540) proporciona una presión sustancialmente uniforme a través del área del cartucho microfluídico (200) cuando el cartucho está presente dentro de la bandeja receptora (520), y en el que la presión sustancialmente uniforme facilita el contacto térmico sustancialmente uniforme entre las cámaras de reacción y los calentadores.
40
9. El aparato (10) de la reivindicación 1, en el que la placa de aberturas (540) es más delgada alrededor de los bordes de las aberturas que el resto de la placa de aberturas.
45
10. El aparato (10) de la reivindicación 9, en el que la mayoría de la placa de aberturas (540) comprende un espesor de aproximadamente 0,63 cm y los bordes de las aberturas (557) comprenden un espesor de aproximadamente 0,48 cm.
50
11. El aparato (10) de la reivindicación 1, en el que la placa de aberturas (540) proporciona una presión sustancialmente uniforme a través del área del cartucho microfluídico (200) cuando el cartucho está presente dentro de la bandeja receptora (520).
- 55 12. El aparato (10) de la reivindicación 1, en el que cada una de las fuentes de luz (726a) de la pluralidad de pares de detectores (726) está alineada en una primera fila en el cabezal detector (700) y cada uno de los detectores de luz (726b) de la pluralidad de pares de detectores está alineado en una segunda fila en el cabezal detector.
- 60 13. El aparato (10) de la reivindicación 12, en el que la placa de aberturas (540) comprende M filas de aberturas (557), el cabezal detector (700) comprende al menos N filas de pares de detectores y fuentes de luz (726), y el cabezal detector está configurado para ser movido al menos a $M + N - 1$ posiciones sobre la placa de aberturas.
14. El aparato (10) de la reivindicación 1, en el que la placa de aberturas (540) comprende un revestimiento de conversión química y/o una superficie de la placa de aberturas se trata para reducir la autofluorescencia.
65

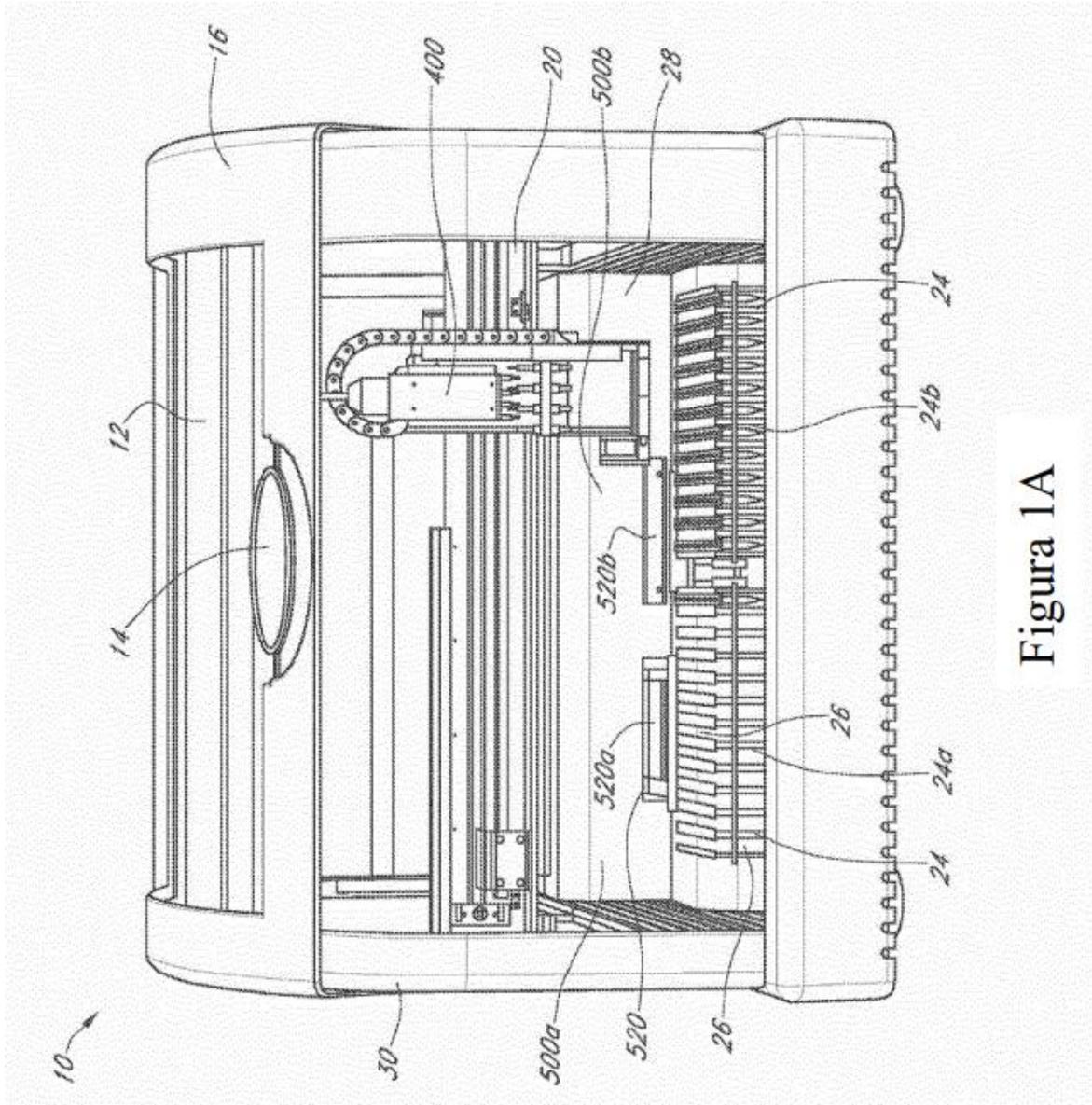


Figura 1A

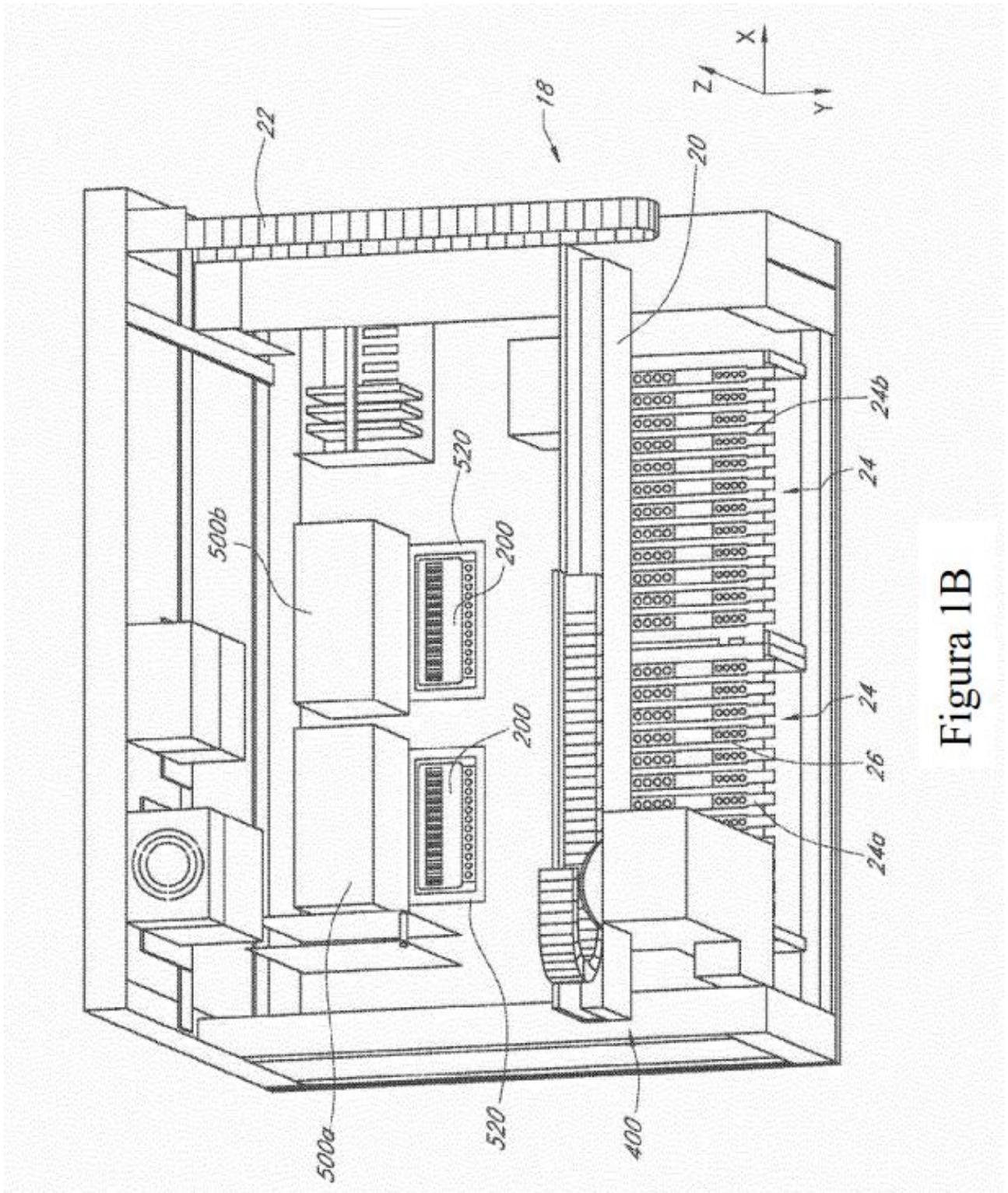


Figura 1B

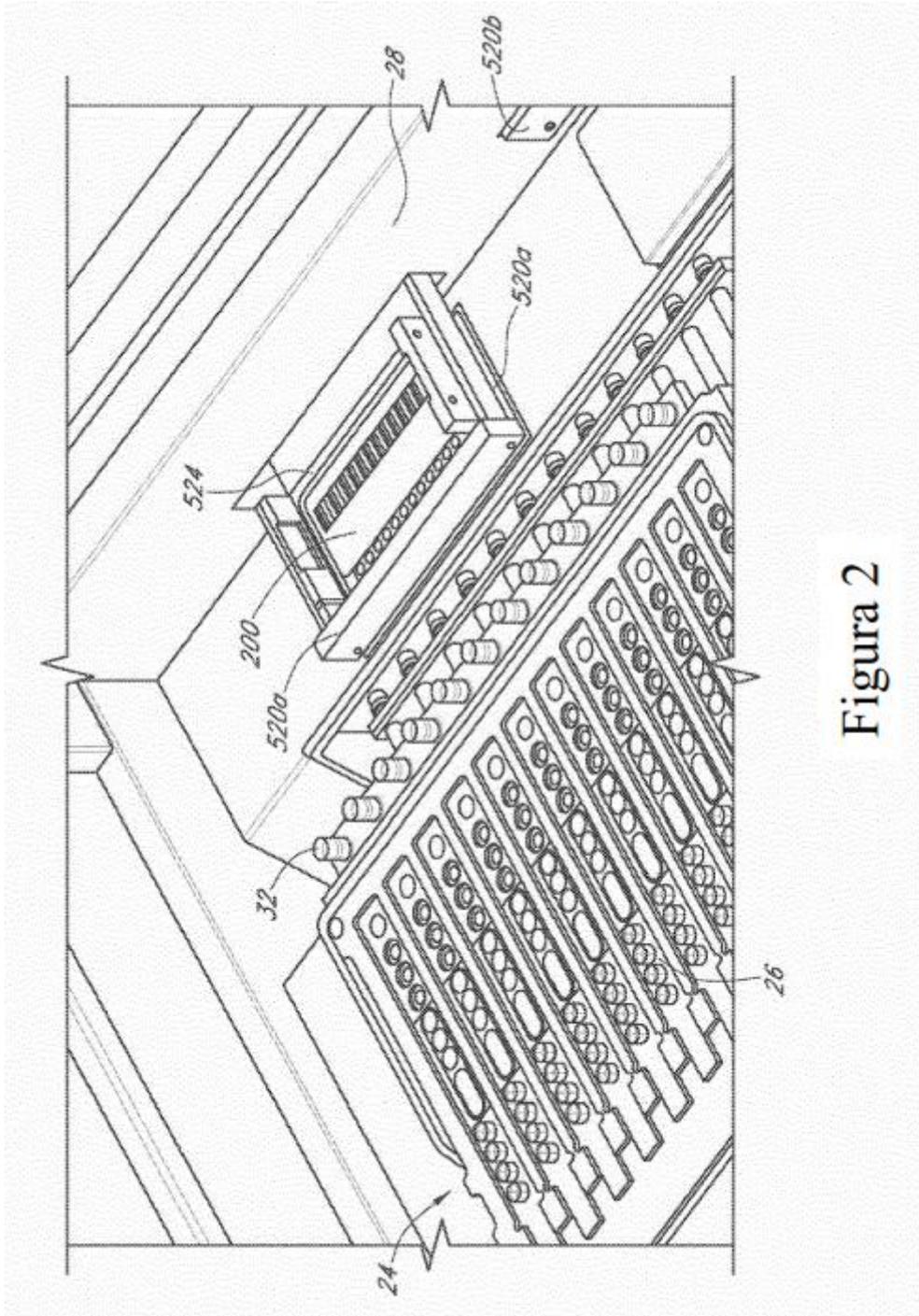


Figura 2

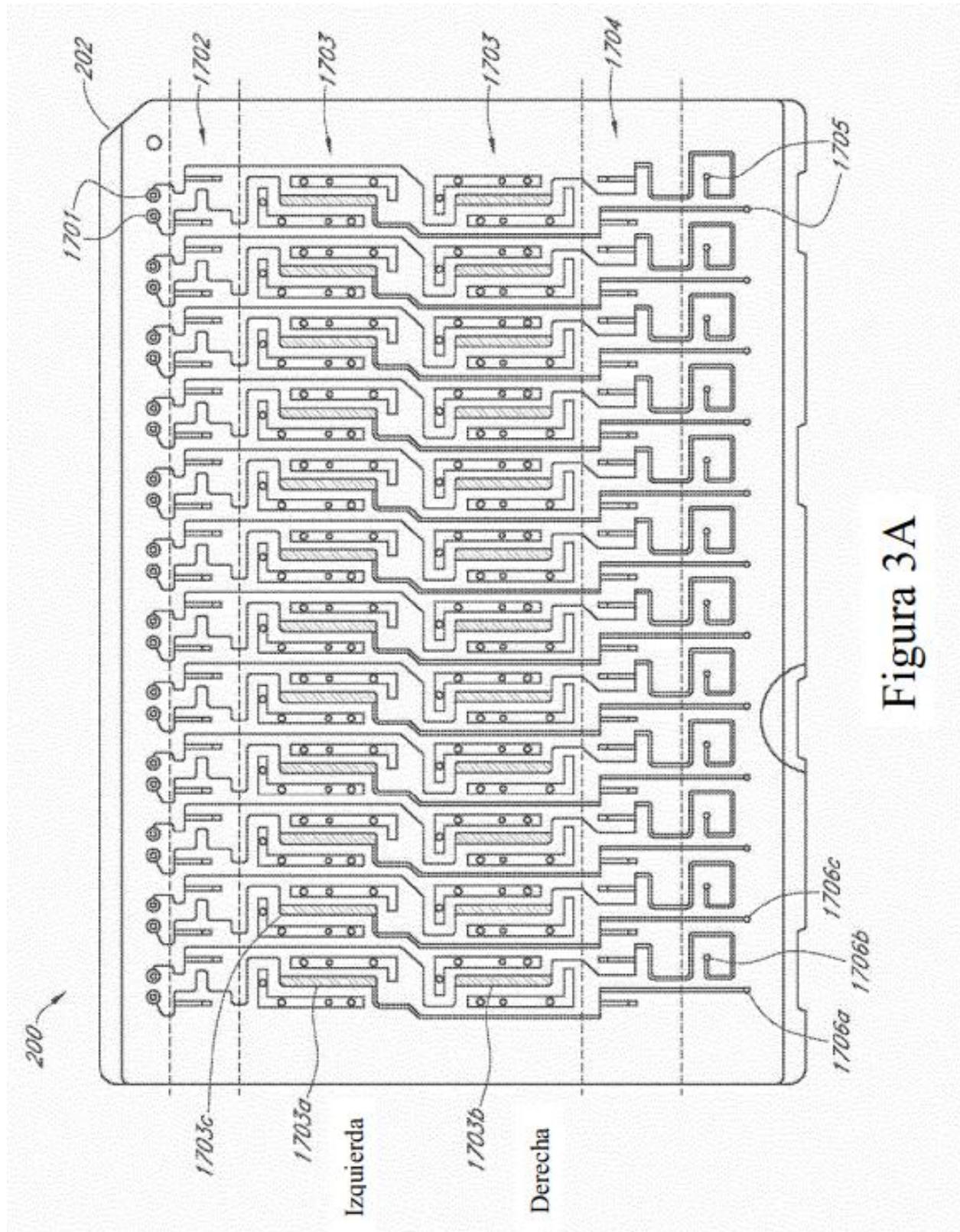


Figura 3A

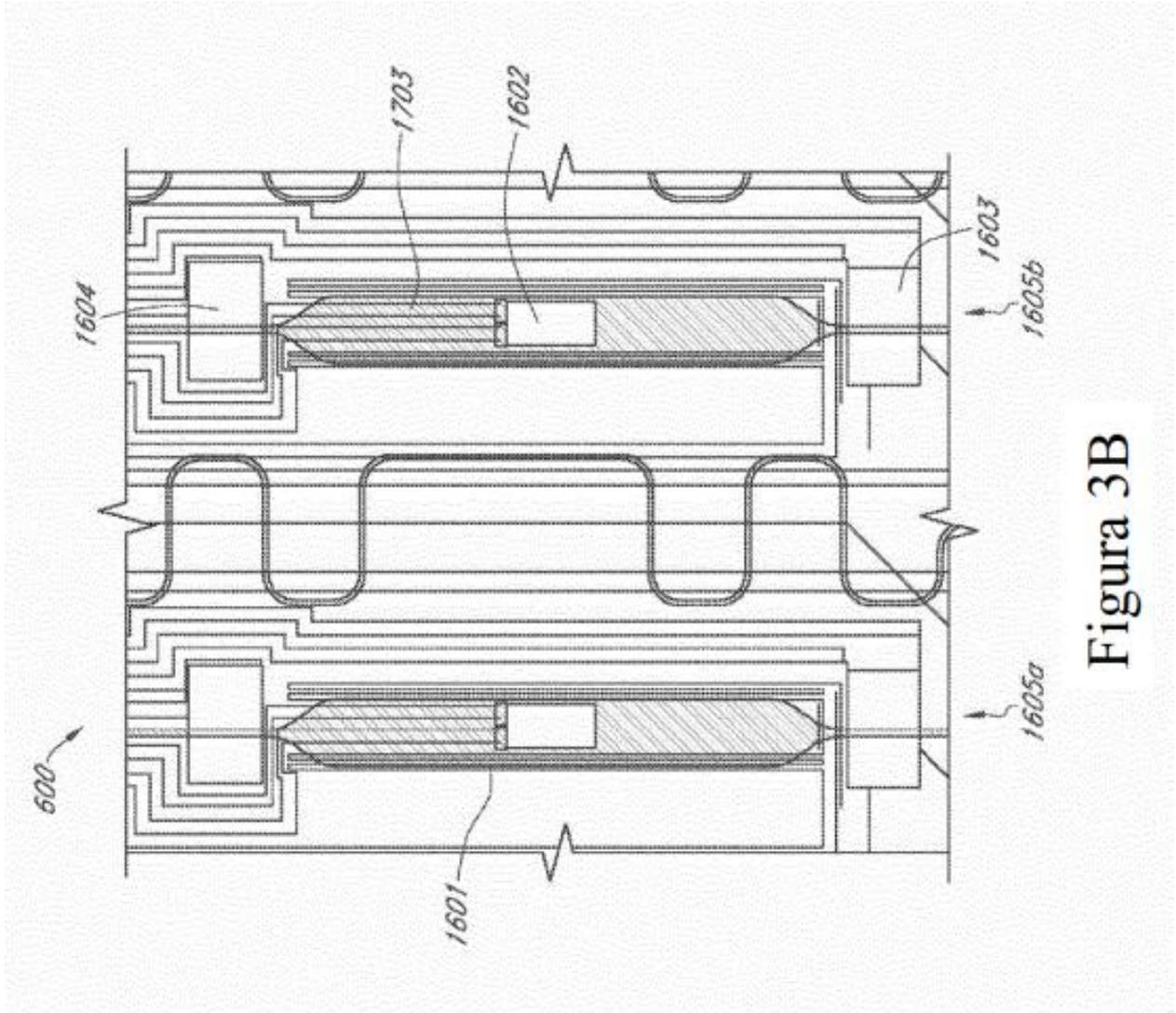
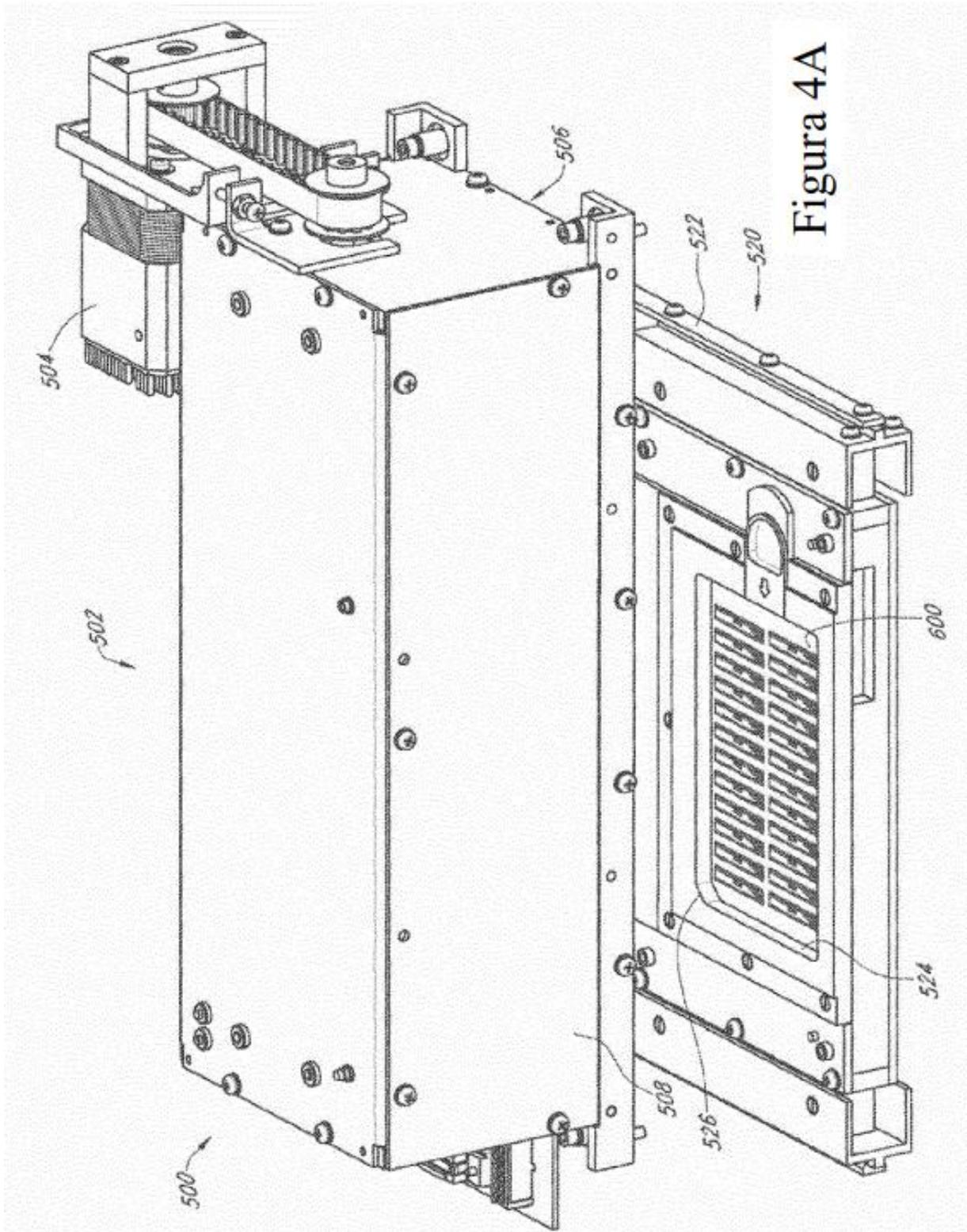
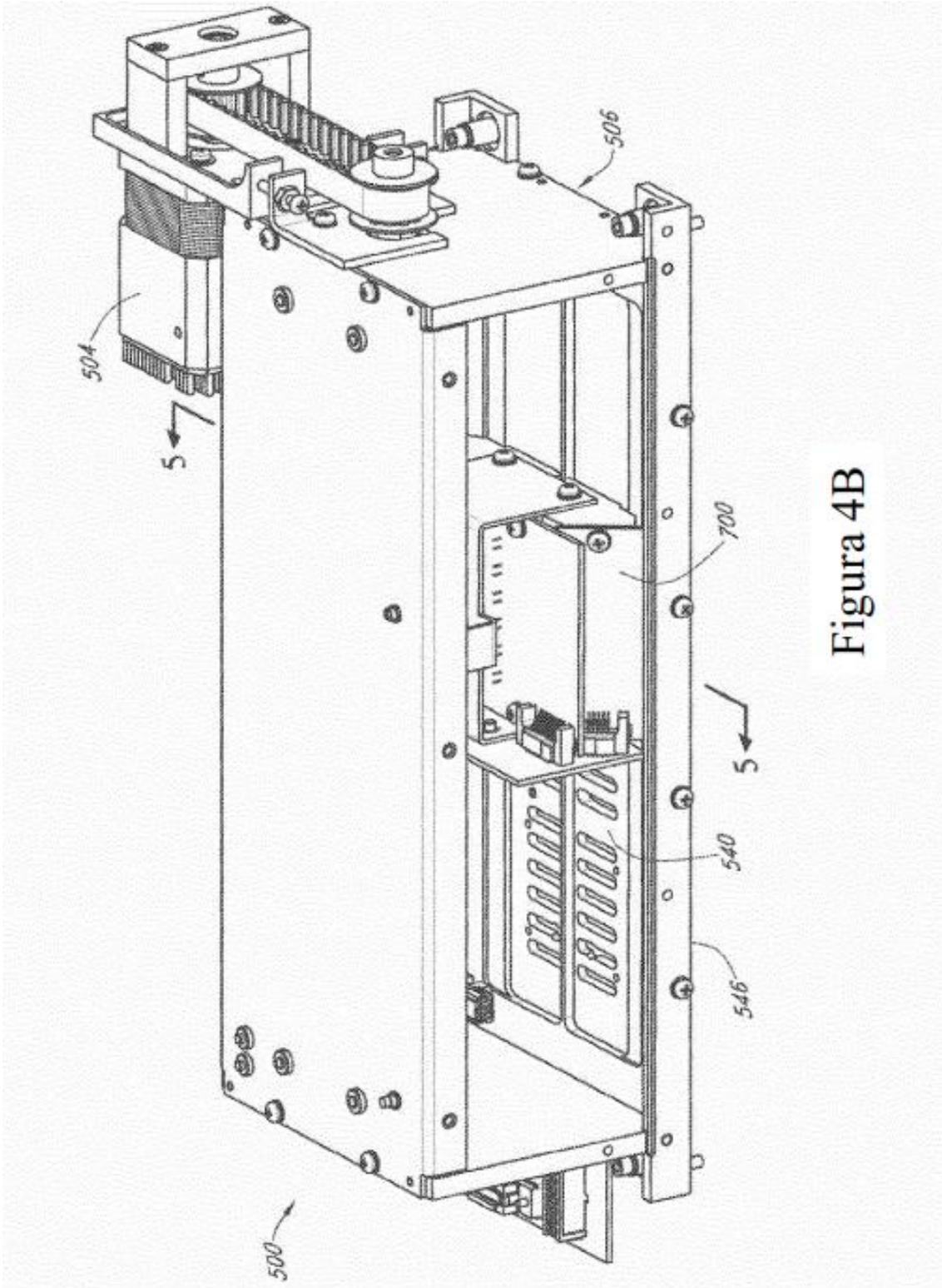


Figura 3B





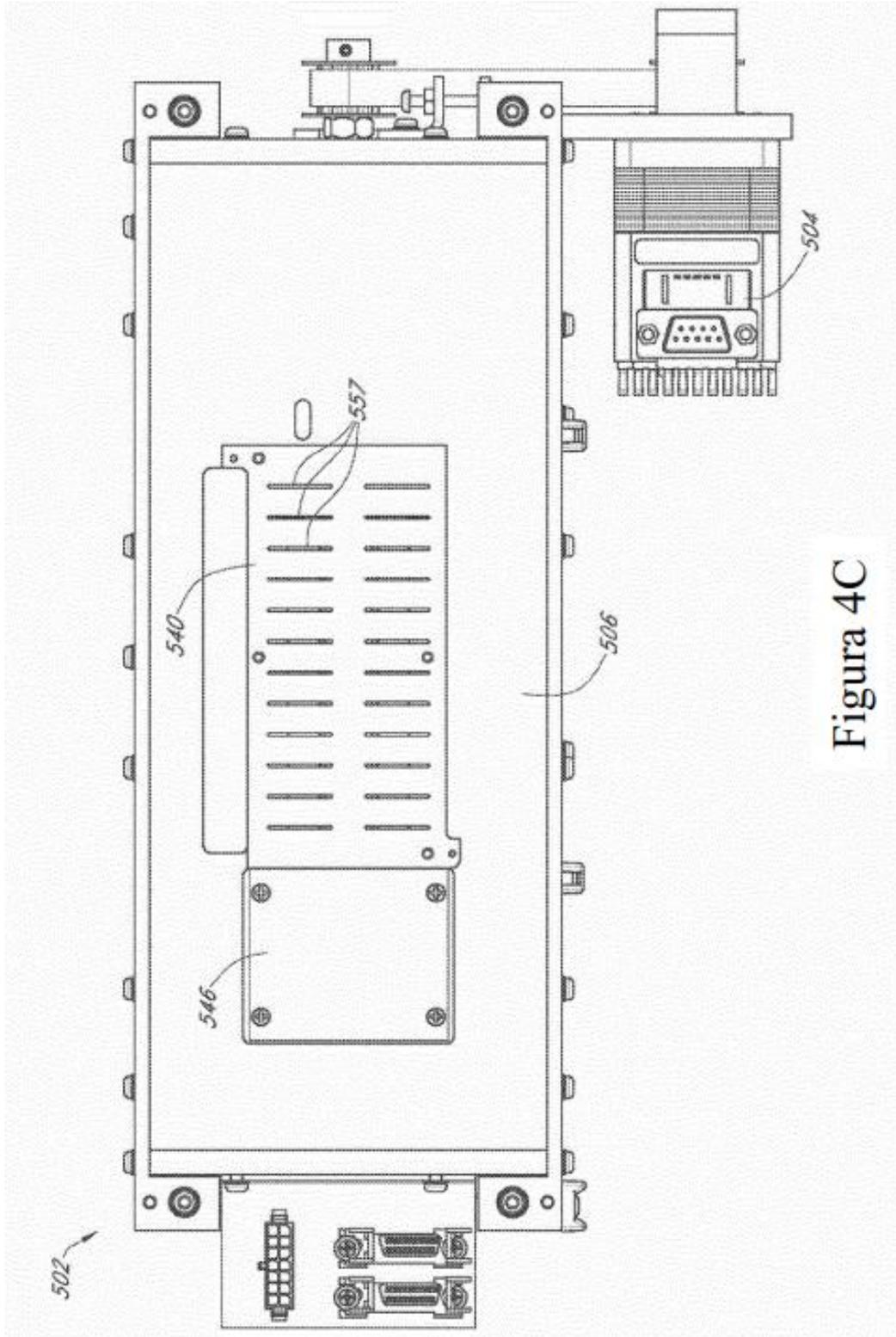


Figura 4C

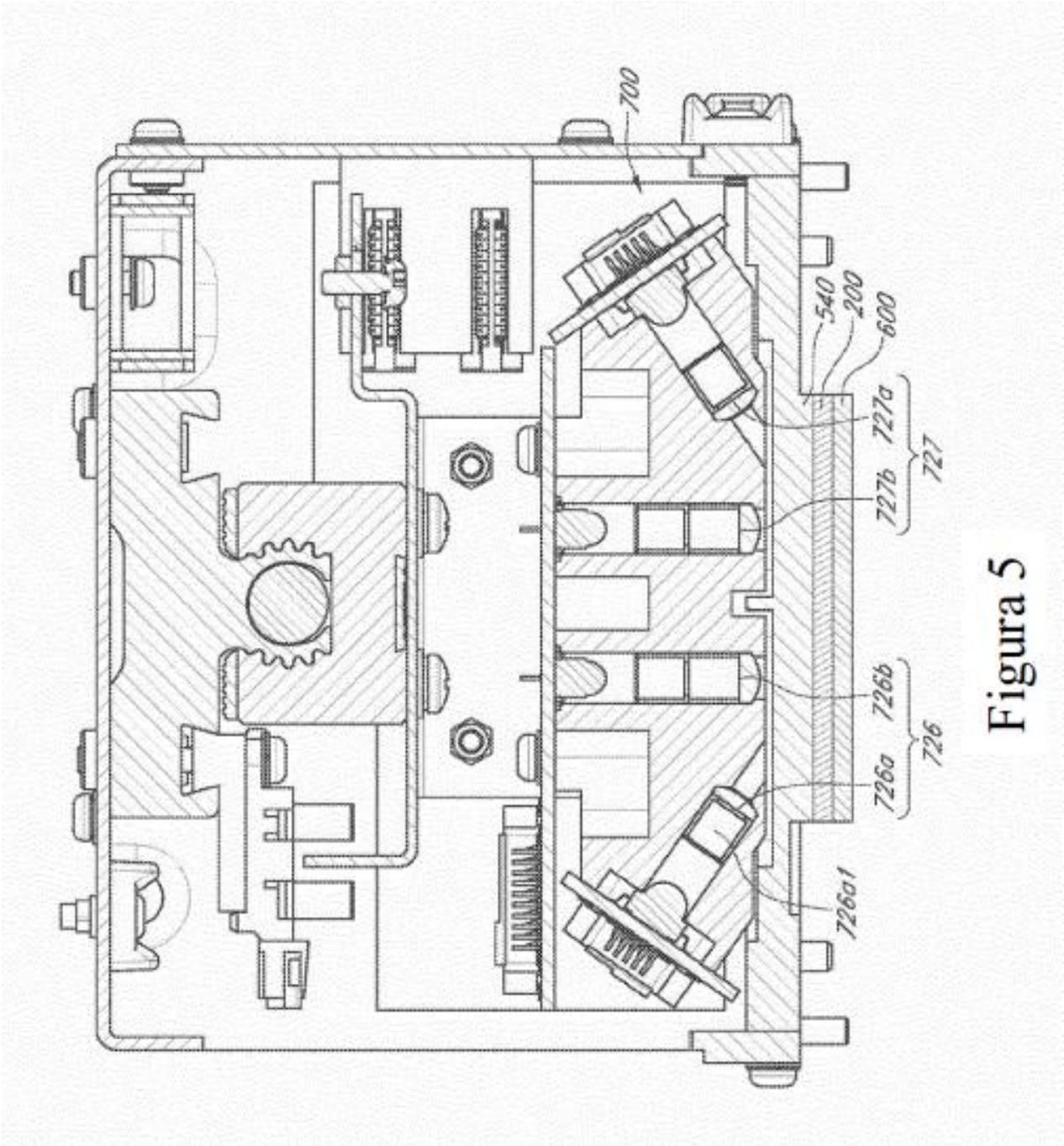


Figura 5

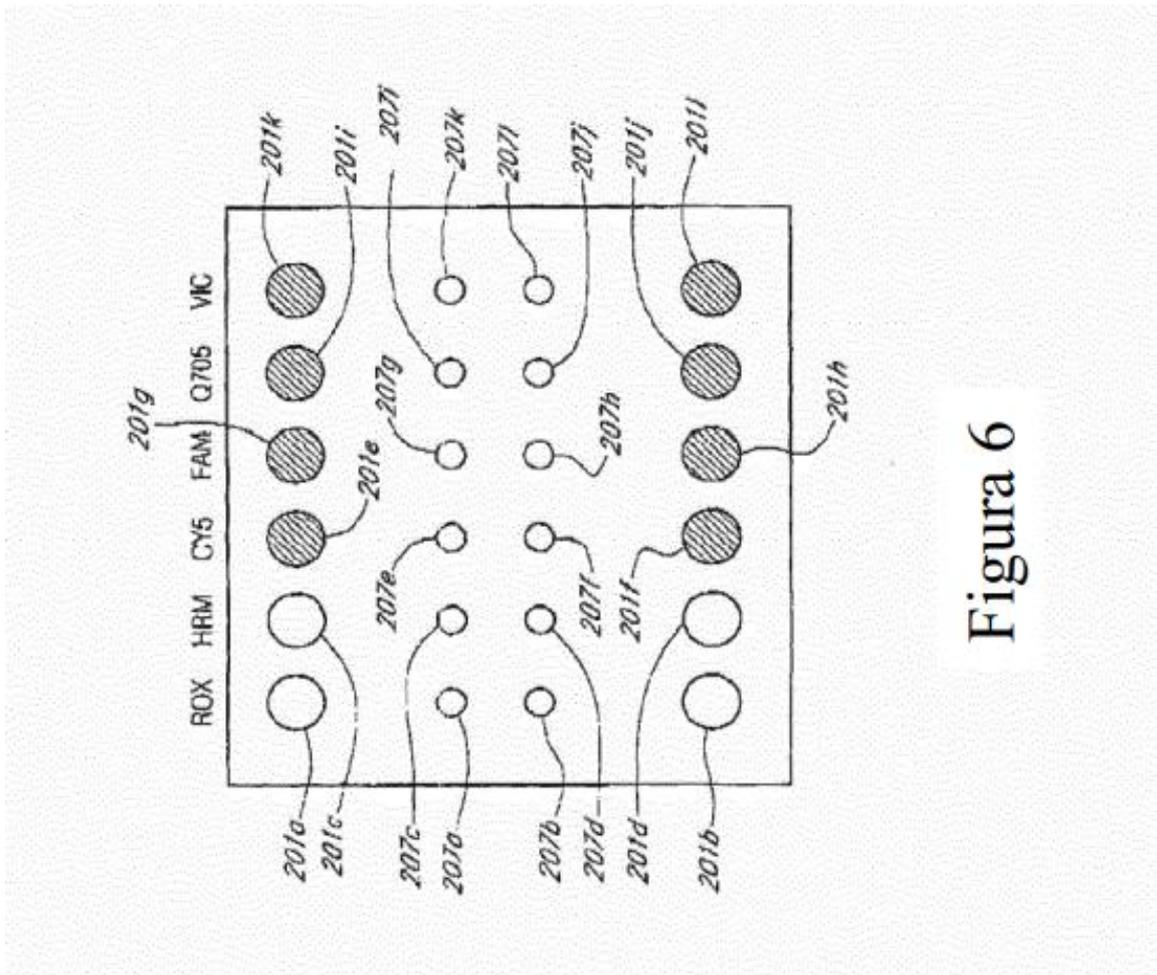


Figura 6

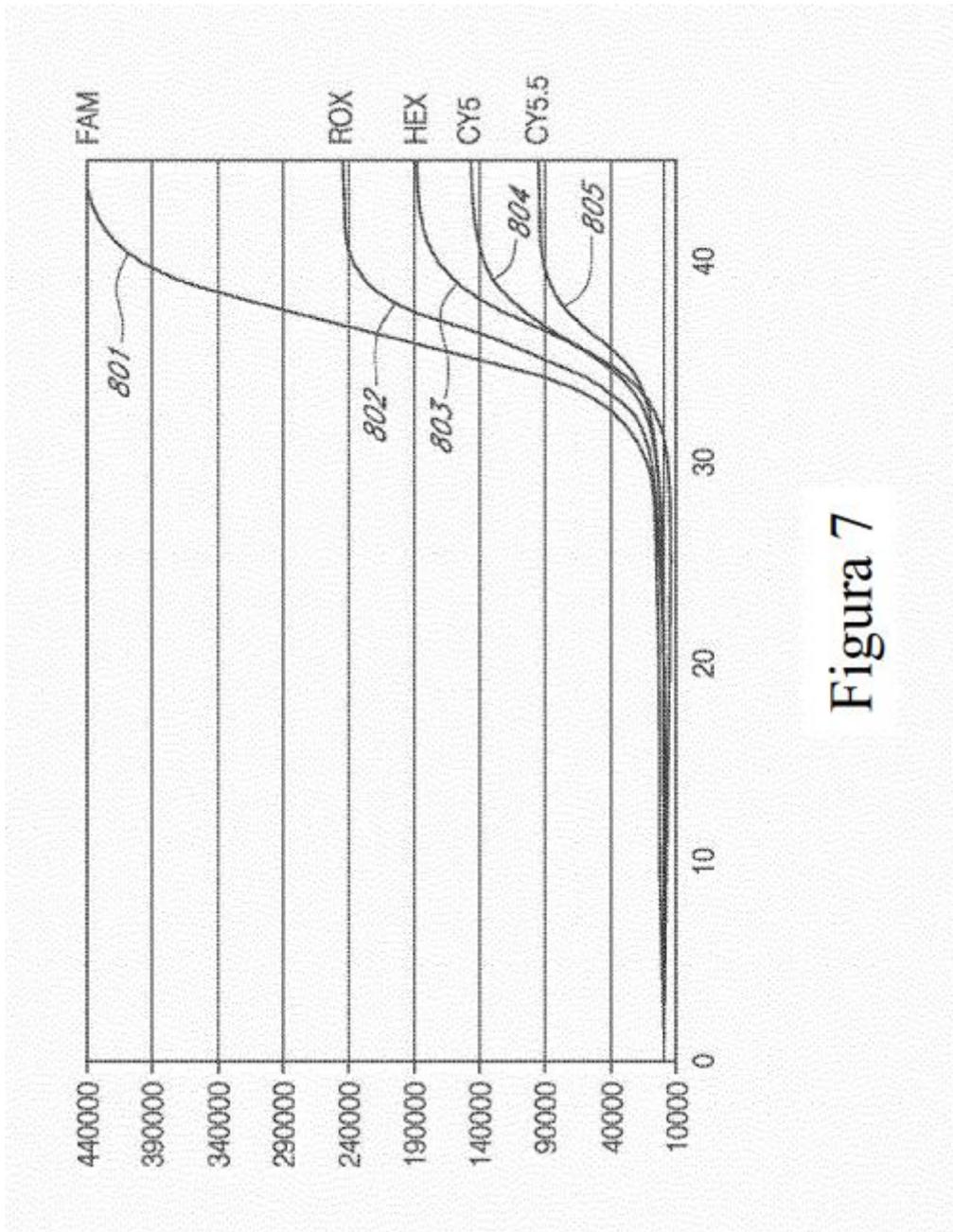


Figura 7

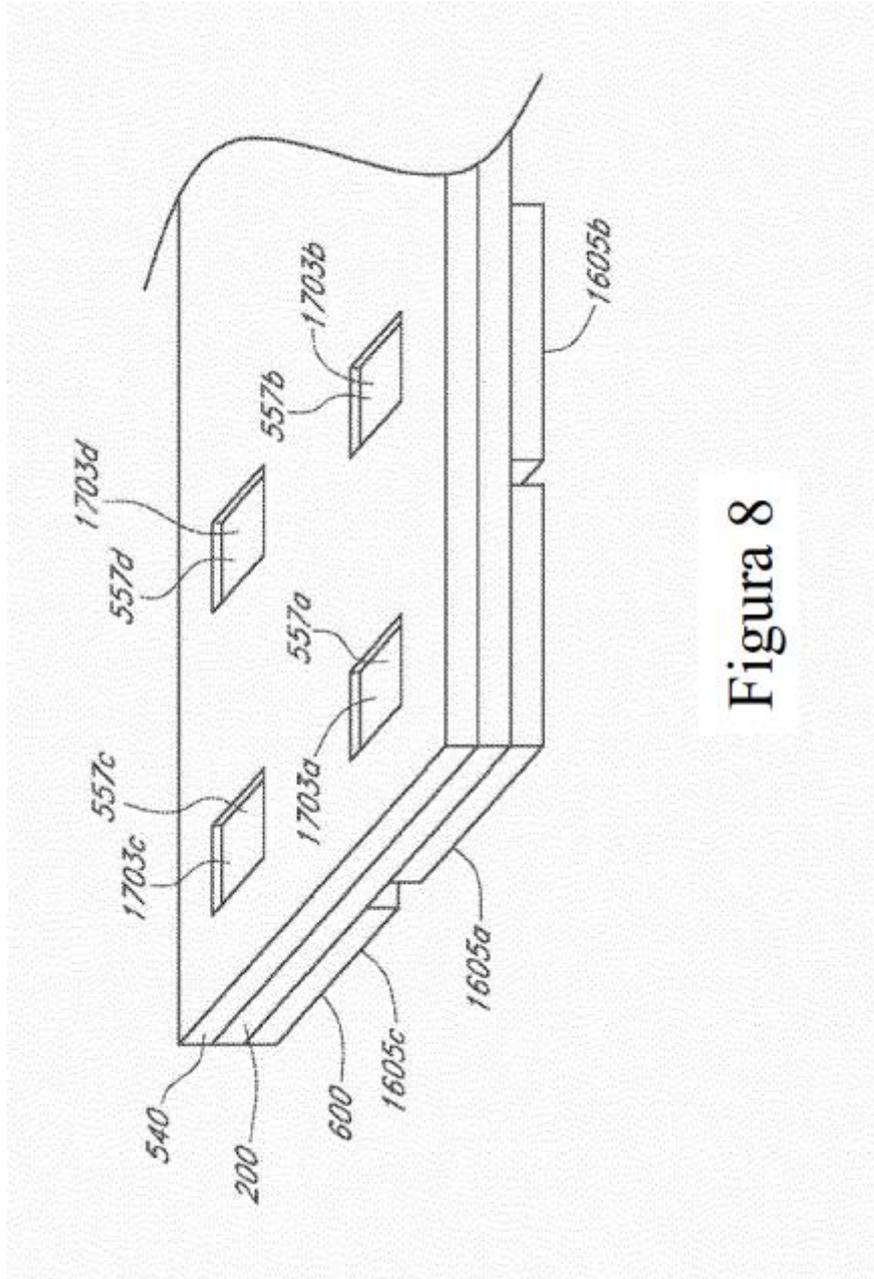


Figura 8

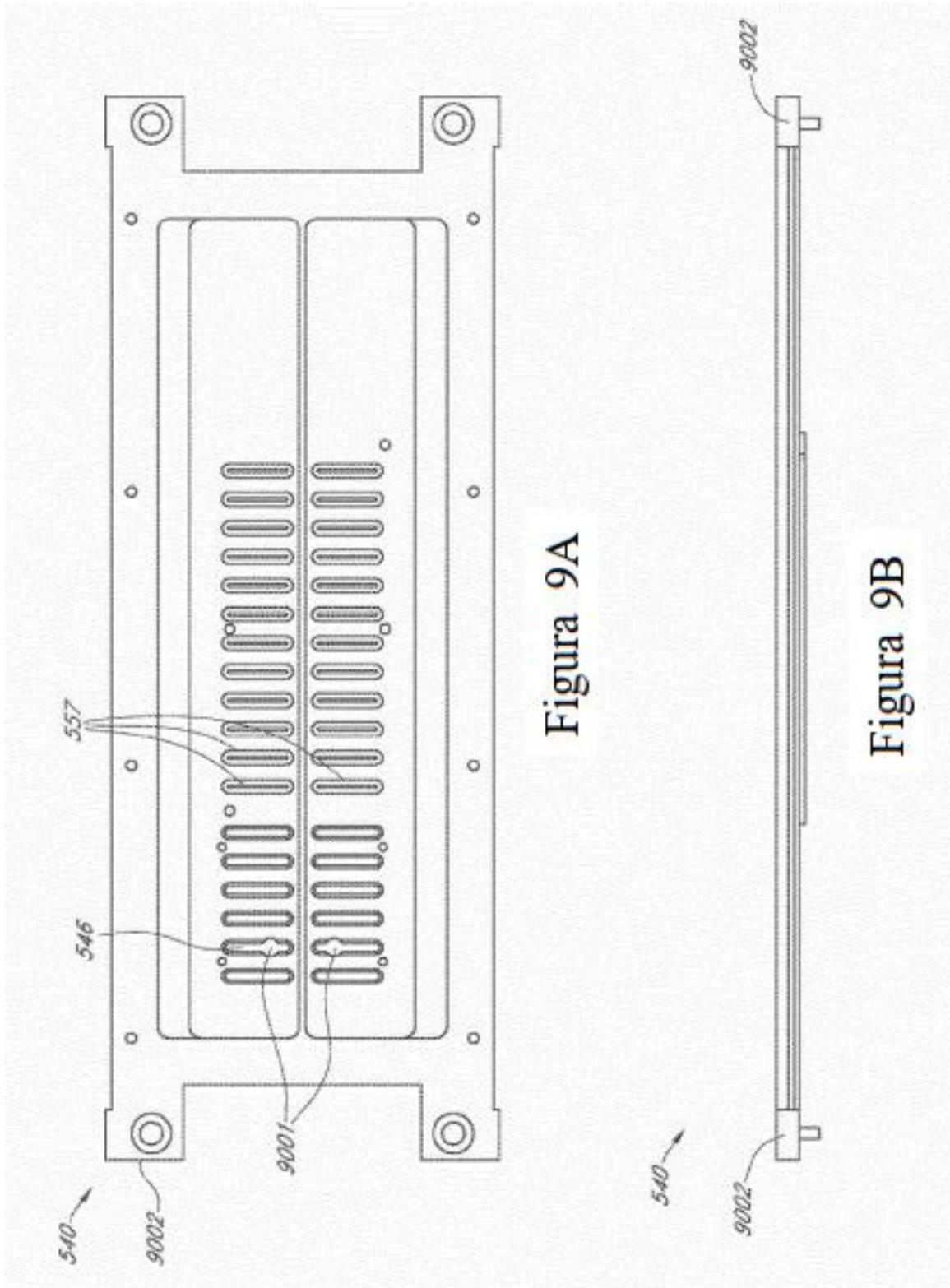


Figure 9A

Figure 9B

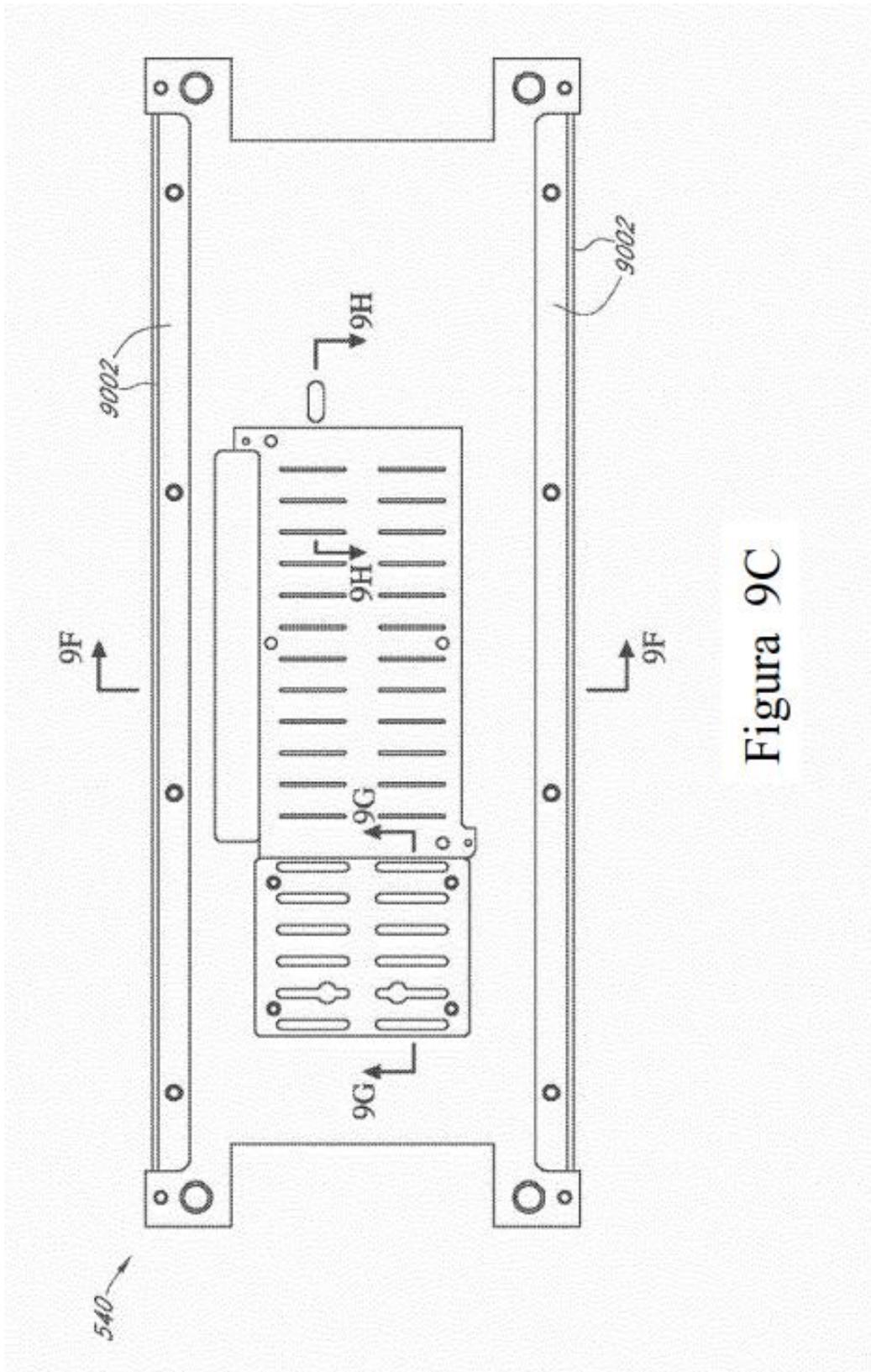


Figura 9C

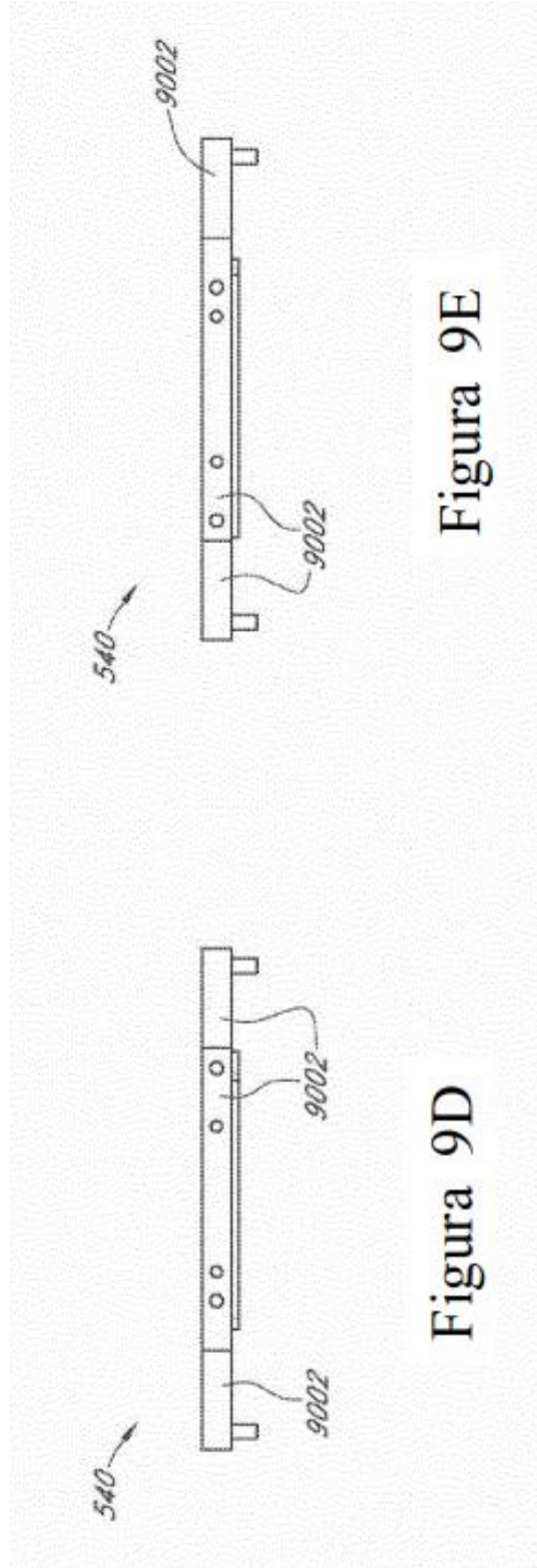


Figura 9E

Figura 9D

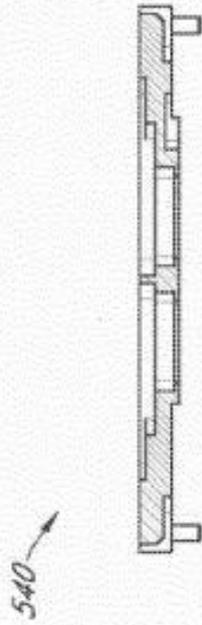


Figura 9F



Figura 9H



Figura 9G

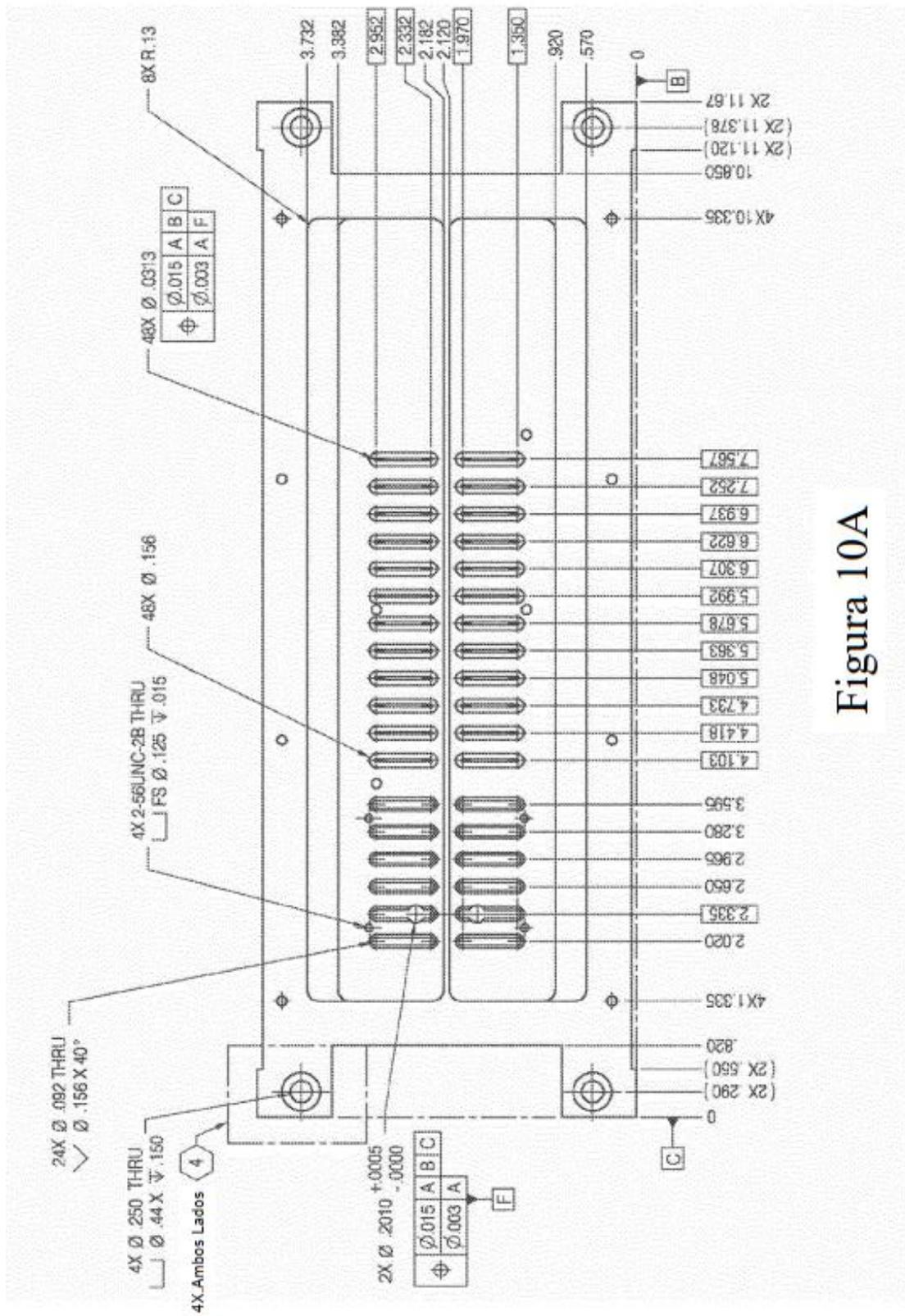


Figura 10A

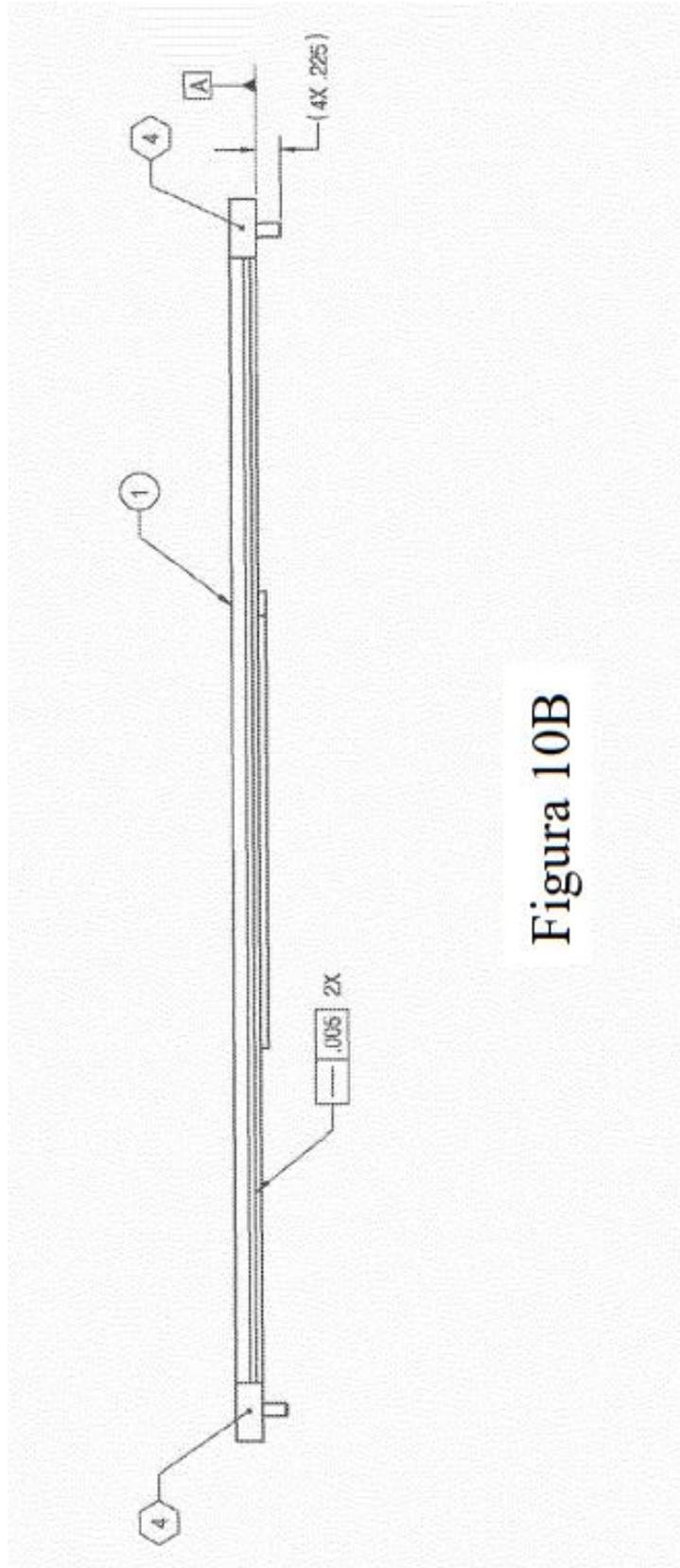


Figura 10B

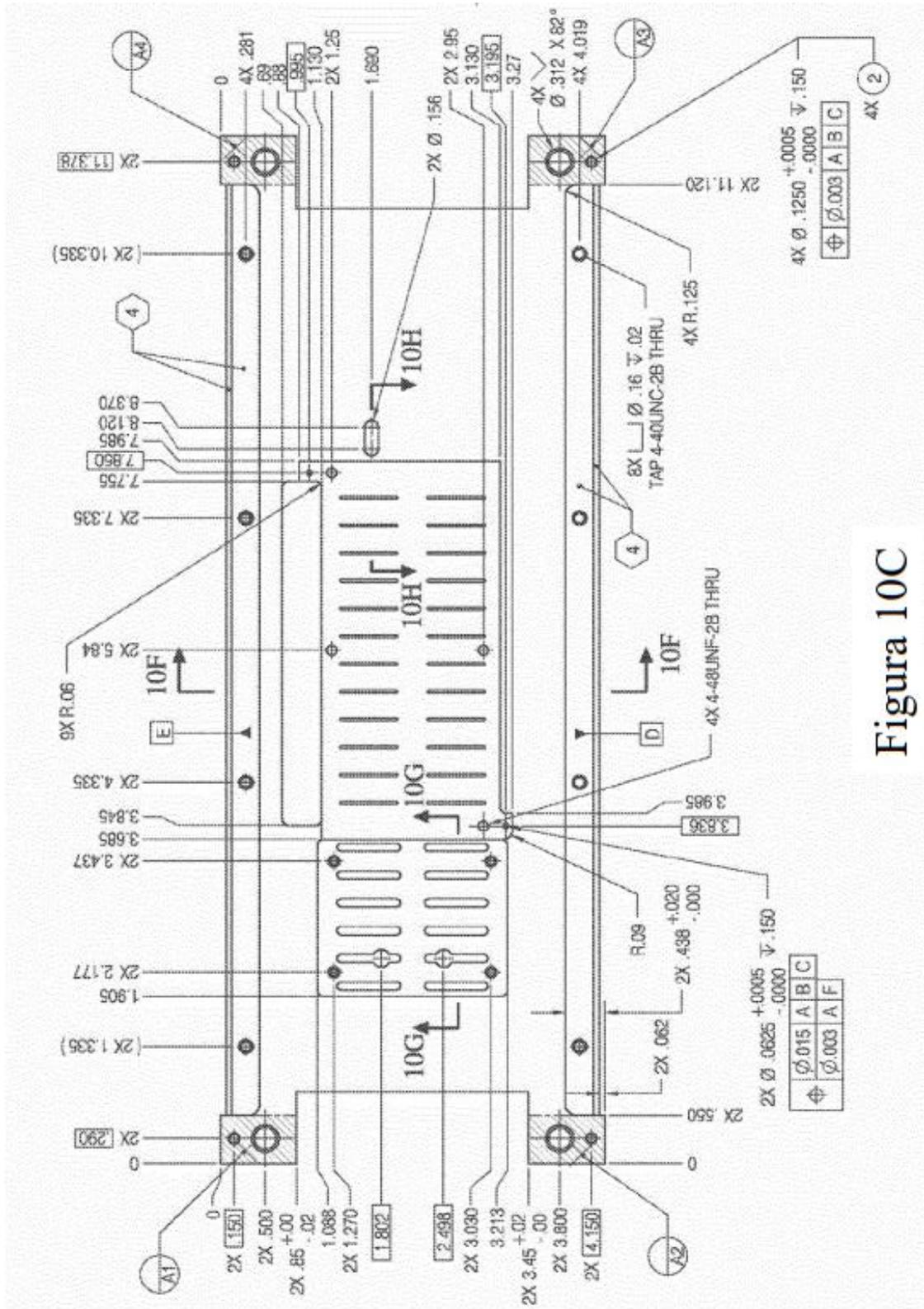
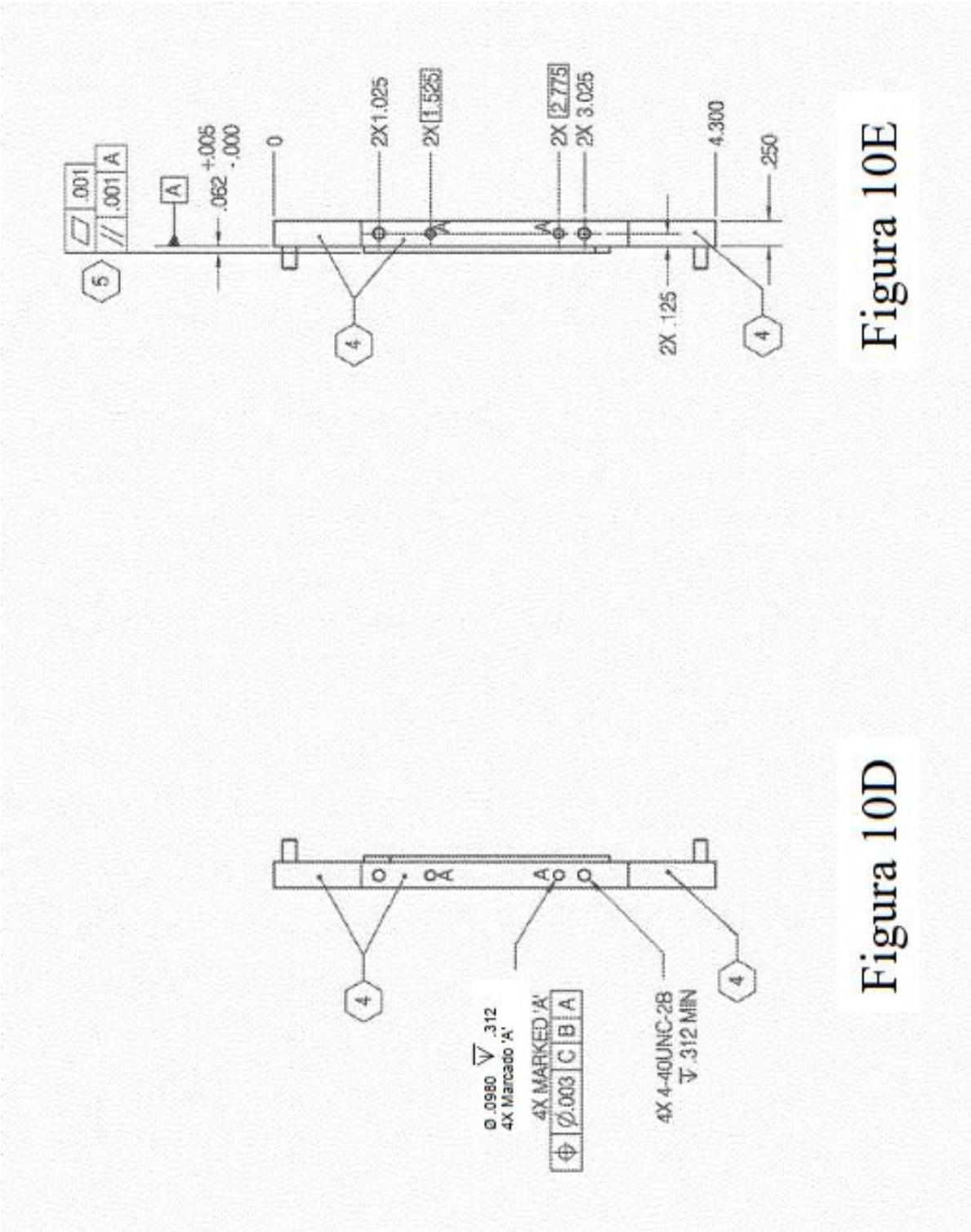


Figura 10C



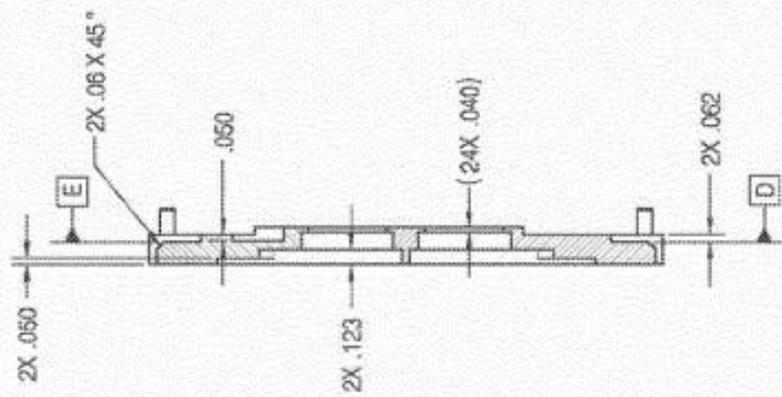


Figura 10F

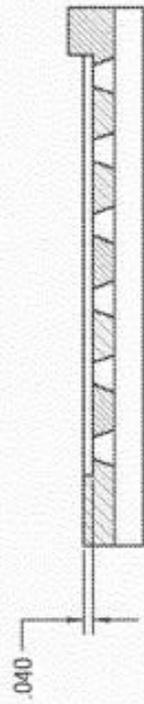


Figura 10G

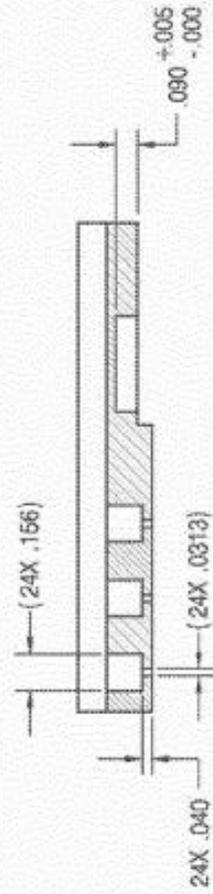


Figura 10H

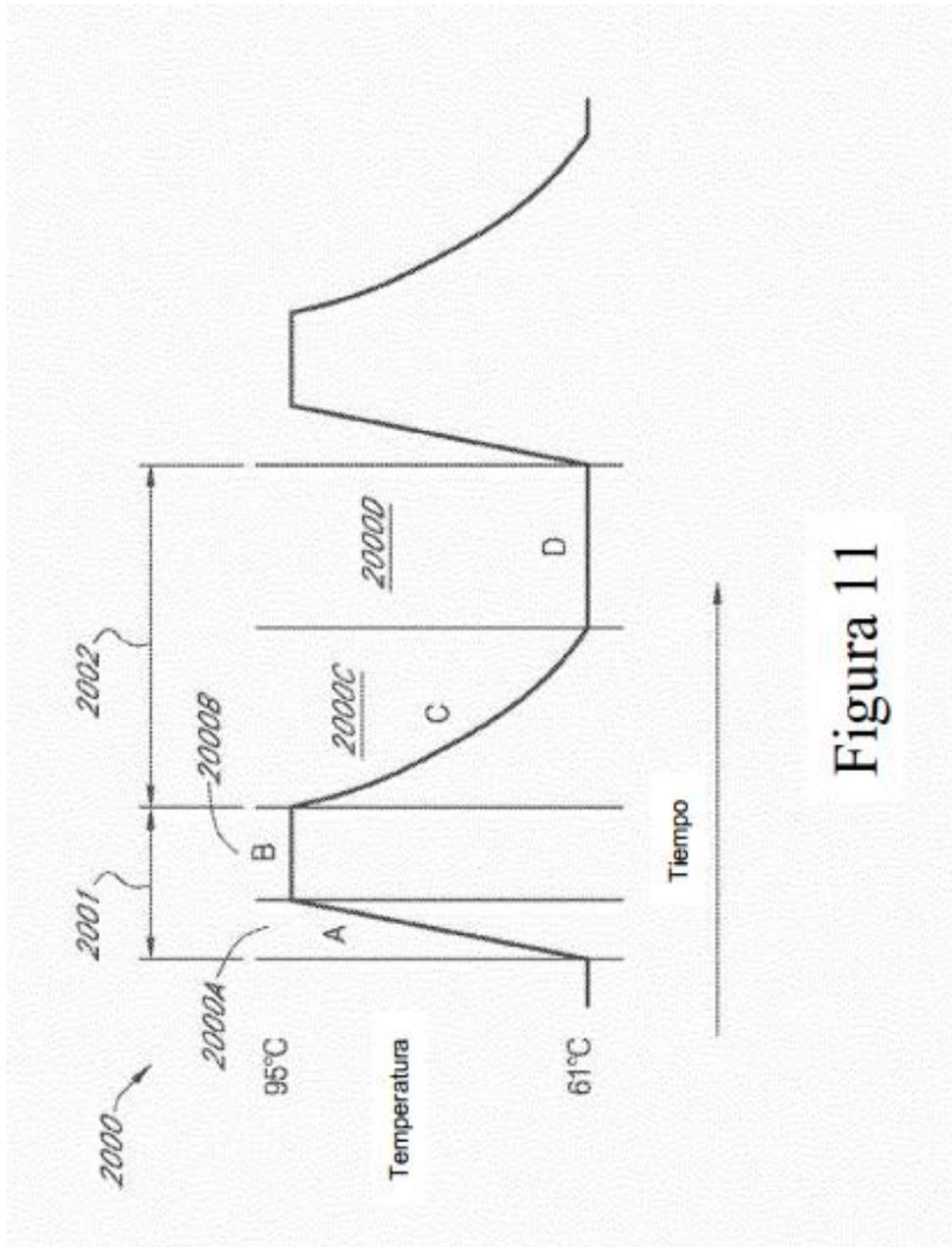
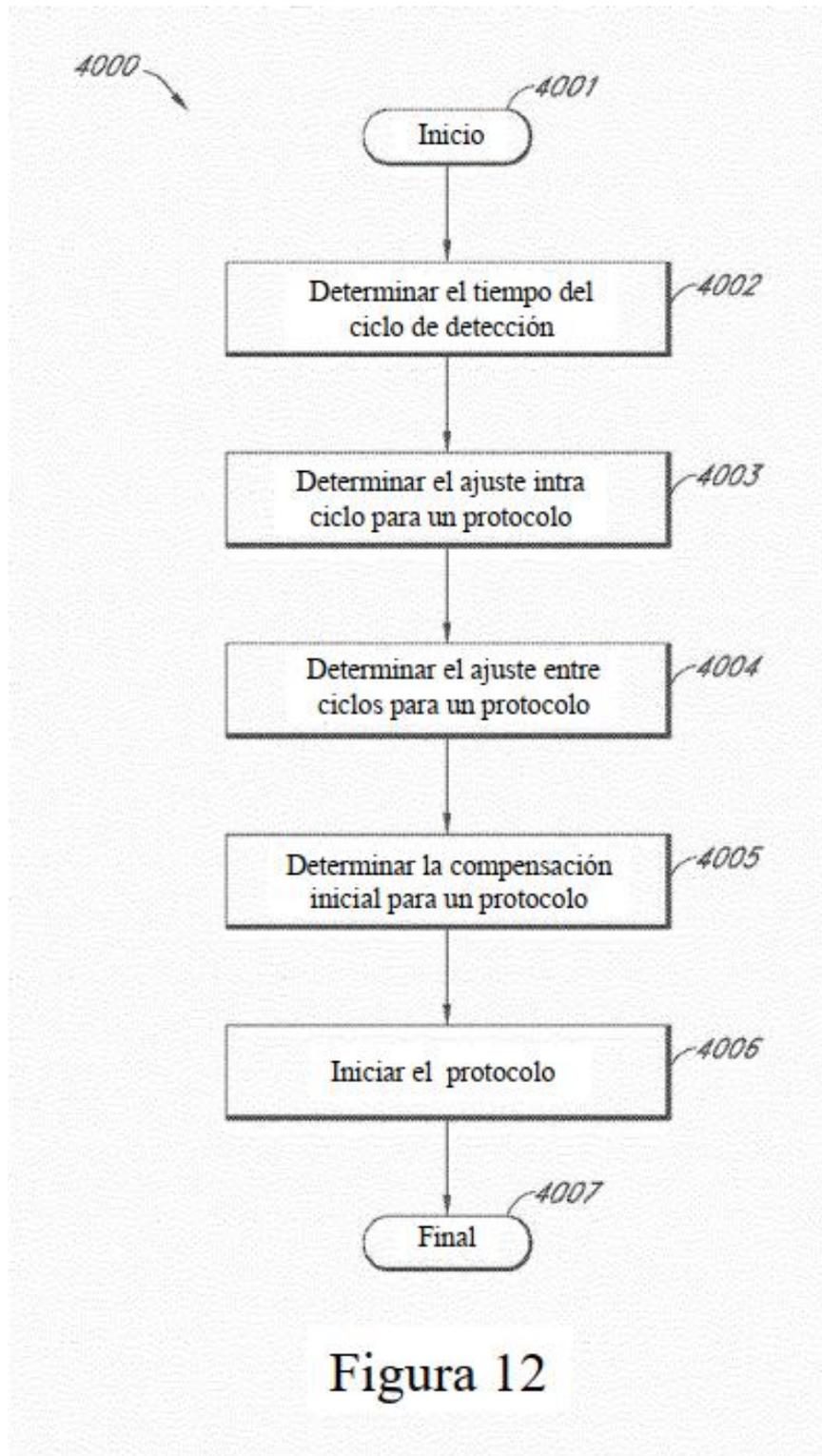


Figura 11



5000

5001

5002

5011

5003a

5003b

5004

Detalles de la prueba

Incubar

Ciclos: 1

Tipo de Perfil: Mantener

Tipo	Tiempo (s)	Temp. (°C)	Detección
	900.0	95.0	<input type="checkbox"/>

Esta etapa es válida

PCR

Ciclos: 45

Tipo de Perfil: 2 - Temperatura

Tipo	Tiempo (s)	Temp. (°C)	Detección
	2.0	95.0	<input type="checkbox"/>
	10.2	61.0	<input checked="" type="checkbox"/>

Esta etapa no es válida. Debe añadir 4,3 segundos o eliminar 5,7 segundos

Figura 13

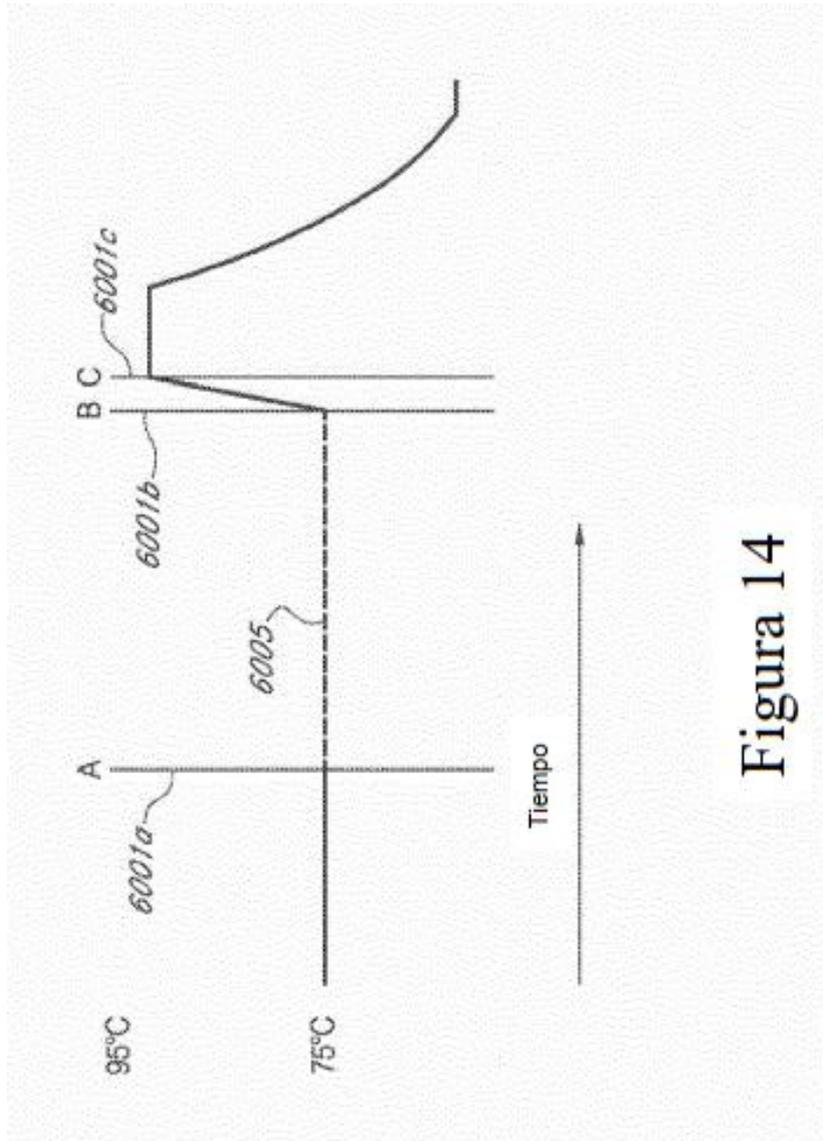


Figura 14

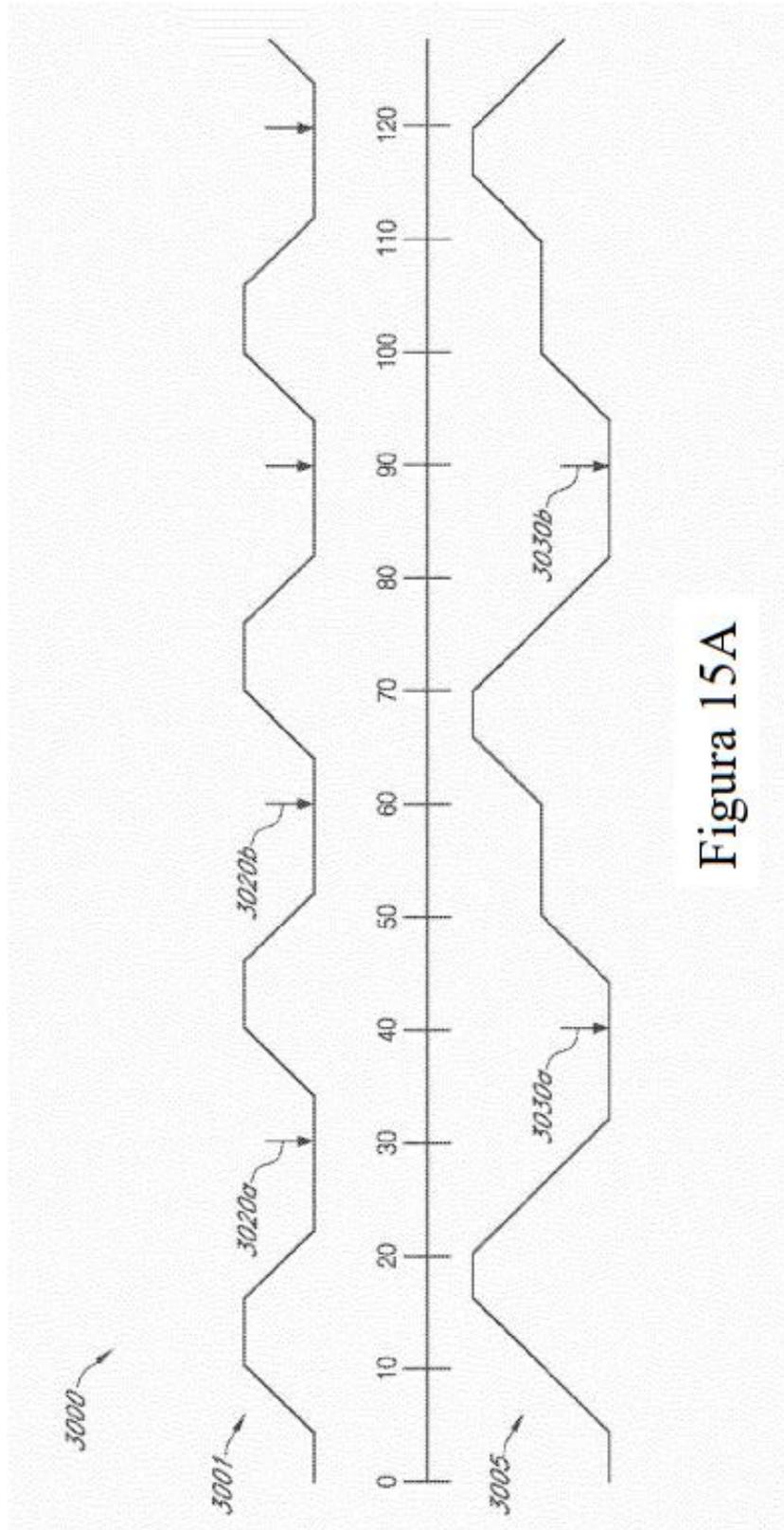


Figura 15A

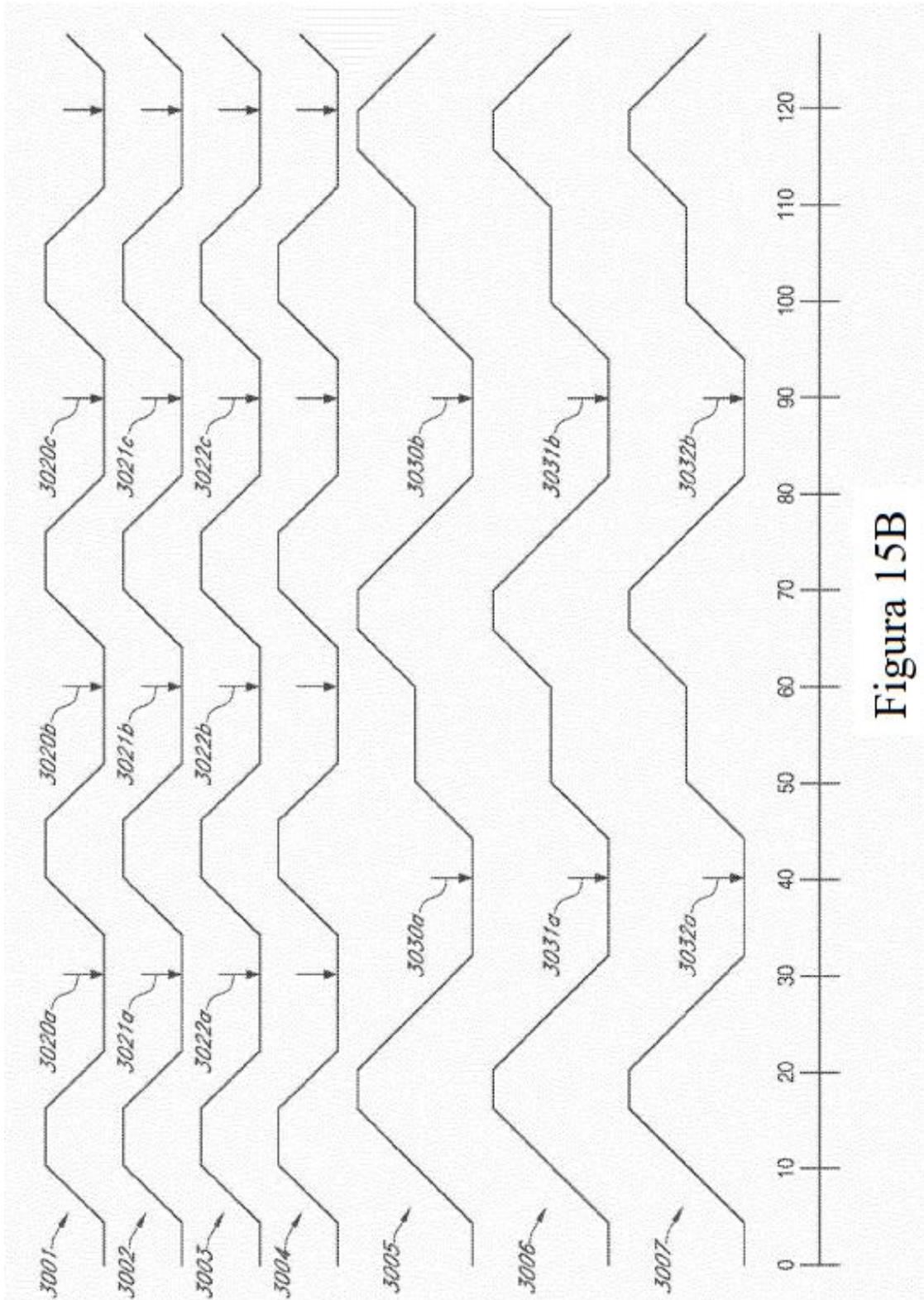


Figure 15B

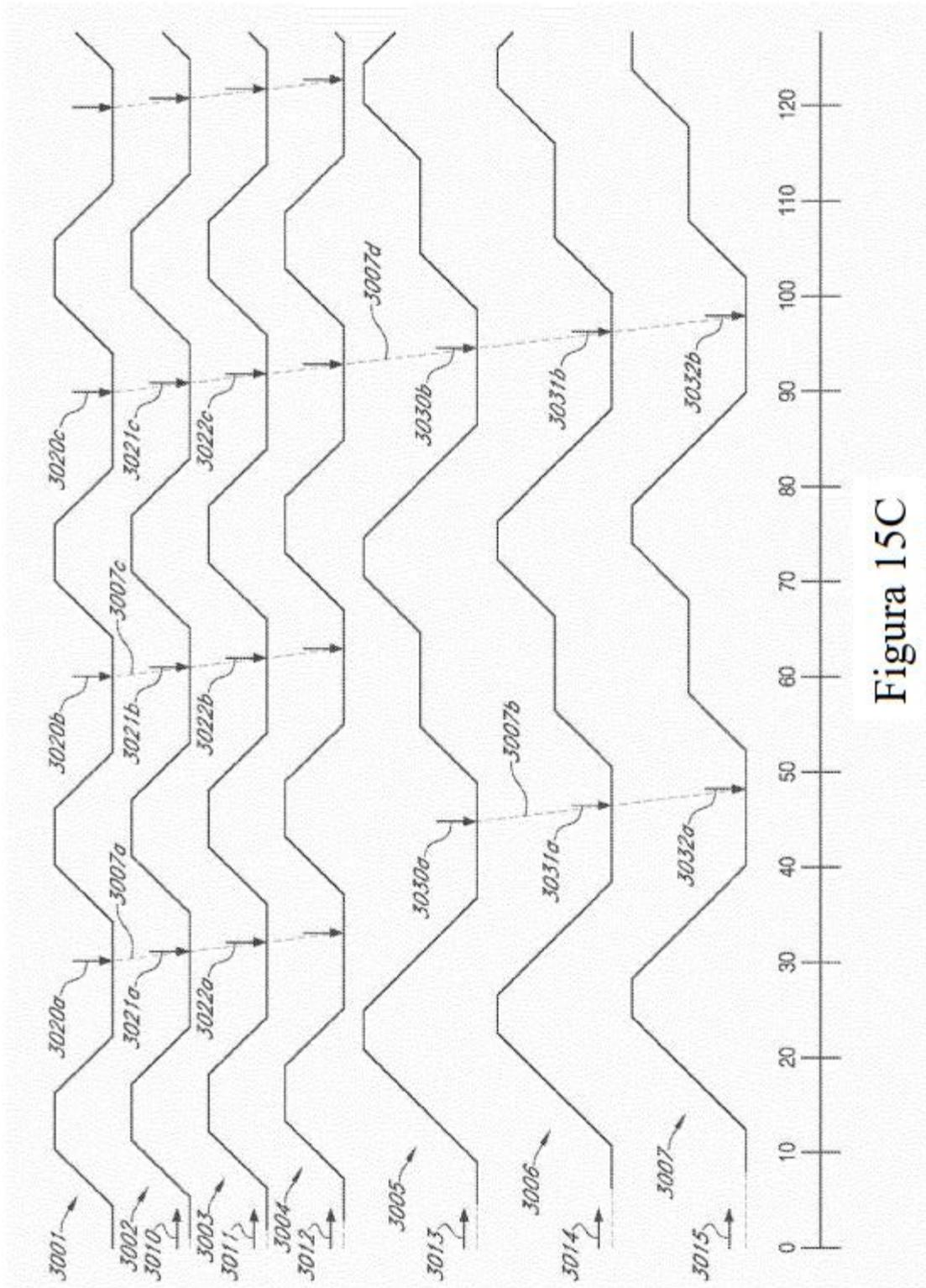


Figura 15C

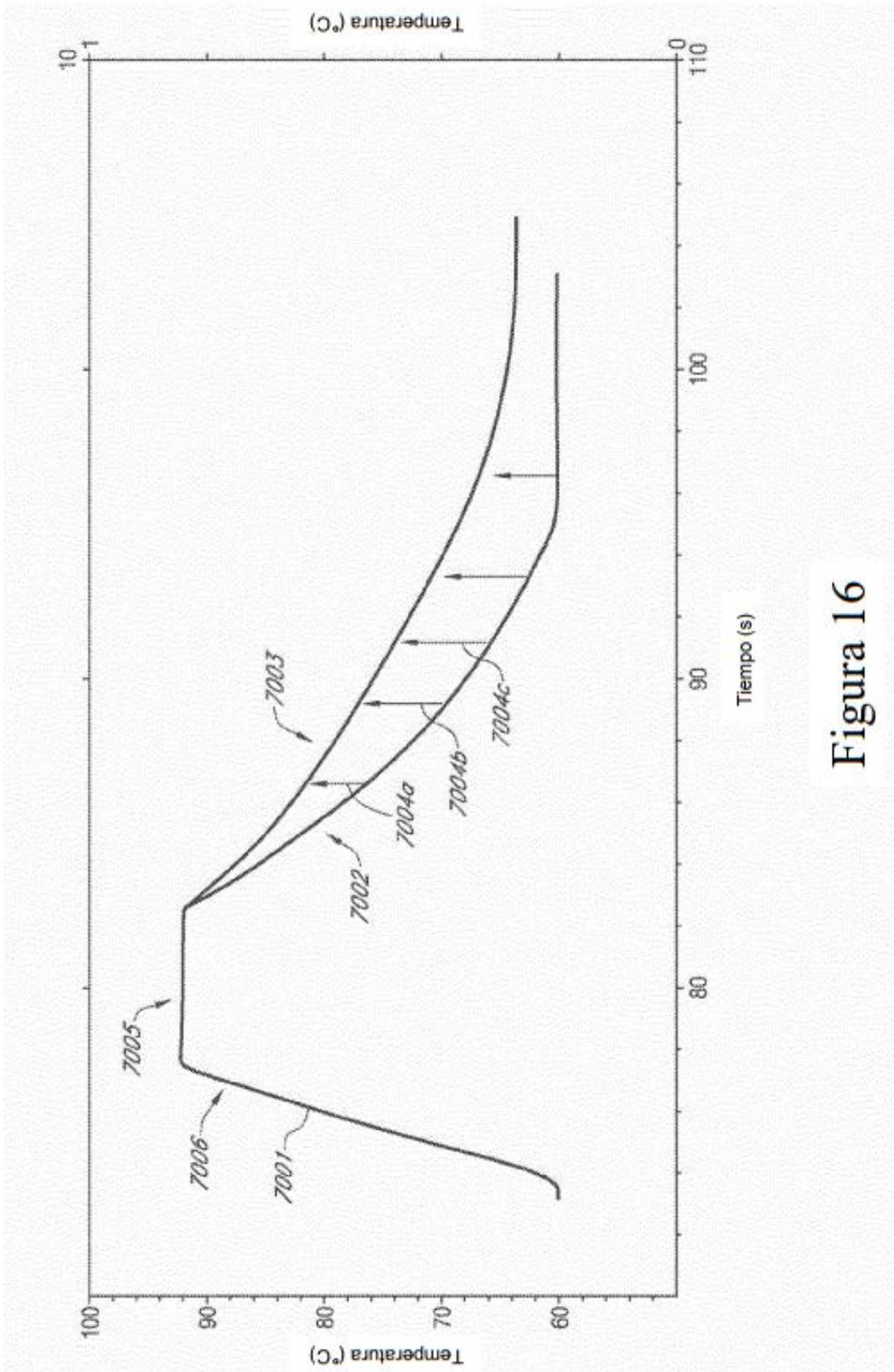


Figura 16