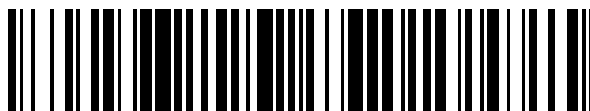


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 369**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6851 (2008.01)

G16B 20/00 (2009.01)

G16B 25/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2010 E 18169040 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3375891**

54 Título: **Métodos y dispositivos para compensación de interferencia espectral en la amplificación multiplex de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

10.09.2009 US 241307 P

24.06.2010 US 358287 P

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

04.11.2020

73 Titular/es:

DIASORIN S.P.A. (100.0%)

Via Crescentino snc

13040 Saluggia (Vercelli), IT

72 Inventor/es:

LUDOWISE, PETER D.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 791 369 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

Métodos y dispositivos para compensación de interferencia espectral en la amplificación multiplex de ácidos nucleicos

5

Campo técnico

La descripción se refiere a técnicas para la amplificación de ácidos nucleicos y, más particularmente, a técnicas para compensar la interferencia espectral durante la detección de especies diana usando colorantes fluorescentes.

10

Antecedentes

La amplificación de ácidos nucleicos se puede usar para secuenciación, clonación, cartografía genética y otras formas de amplificación de la secuencia de ácido nucleico, o para determinar una concentración inicial de ácido nucleico en una muestra construyendo una curva estándar de resultados de muestras que incluya concentraciones conocidas, u otras formas de amplificación de ácidos nucleicos. La amplificación de ácidos nucleicos puede usarse para analizar ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, ADN y ARN. Los tipos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación mediada por transcripción (TMA), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA).

15

20

En general, la PCR depende de la capacidad de las enzimas que copian ADN para permanecer estables a altas temperaturas. Un único ciclo de PCR incluye tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. Durante la desnaturalización, una muestra líquida se calienta a aproximadamente 94 °C. Durante este proceso, las cadenas dobles de ADN se "fusionan" para formar ADN monocatenario y se detienen todas las reacciones enzimáticas. Durante la hibridación, el ADN monocatenario se enfría a 54 °C. A esta temperatura, se unen o "hibridan" cebadores a los extremos de las cadenas de ADN. Durante la extensión, la muestra se calienta a 75 °C. A esta temperatura, se añaden nucleótidos a los cebadores y finalmente se forma una copia complementaria del molde de ADN. Los análisis por PCR típicamente repiten este ciclo de PCR múltiples veces (por ejemplo, aproximadamente 40) para producir un gran número de cadenas de ADN replicadas.

25

30

La PCR en tiempo real puede usarse para detectar una cantidad relativa de ácido nucleico presente en una muestra a medida que la muestra experimenta una pluralidad de periodos de interrogación de la PCR (por ejemplo, ciclos). Por ejemplo, la muestra puede incluir marcadores que emitan fluorescencia cuando se unen al ADN bicatenario. En este ejemplo, la fluorescencia detectada por un detector es proporcional al número de ADN bicatenario presente en la muestra. Por lo tanto, a medida que avanza la PCR, aumenta la fluorescencia.

35

Los modos de realización de amplificación asociada a transcripción, por ejemplo, amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y amplificación mediada por transcripción (TMA), usan condiciones sustancialmente isotérmicas y una ARN polimerasa para producir múltiples transcritos de ARN a partir de un molde de ácido nucleico usando un promotor-cebador, un cebador, una ARN polimerasa, una ADN polimerasa, desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP), ribonucleósidos trifosfato (rNTP) y un oligonucleótido complementario al promotor-plantilla, y opcionalmente también pueden incluir otros oligonucleótidos. Los ensayos pueden usar sondas de detección para la amplificación de los ácidos nucleicos en las reacciones. Durante la reacción de amplificación, cada sonda de detección se une a su amplicón específico y se convierte en una forma que produce una señal detectable (por ejemplo, una señal quimioluminiscente resistente a hidrólisis o una intensidad de fluorescencia mayor que en la forma no convertida).

40

45

El documento US 2006/051796 se refiere a un método y un kit para amplificar y detectar un ácido nucleico diana, en el que la composición que contiene reactivos para realizar y monitorizar la amplificación del ácido nucleico en tiempo real comprende al menos una primera sonda de hibridación marcada con una primera entidad fluorescente y una pirofosfatasa. El kit puede comprender un medio de almacenamiento legible por ordenador que comprende un "archivo de compensación de color", que es un medio para compensar una interferencia espectral entre diferentes canales de detección que se puede producir en experimentos multiplex, en los que los datos obtenidos en cada experimento están sujetos a una operación matemática específica, para tener en cuenta la interferencia entre diferentes canales de detección.

50

55

Los documentos US 2006/223172 y US 2009/218517 divulgan técnicas para la detección de múltiples especies diana en PCR en tiempo real en las que un sistema comprende un dispositivo de adquisición de datos y un dispositivo de detección acoplado al dispositivo de adquisición de datos. El dispositivo de detección incluye un disco giratorio que tiene una pluralidad de cámaras de proceso que tienen una pluralidad de especies que emiten luz fluorescente a diferentes longitudes de onda. El dispositivo incluye además una pluralidad de módulos ópticos extraíbles. Cada uno de los módulos ópticos extraíbles está configurado ópticamente para excitar las especies y capturar luz fluorescente emitida por las especies a diferentes longitudes de onda. Los componentes ópticos en cada módulo opcional se pueden seleccionar para maximizar la sensibilidad y minimizar la cantidad de

60

65

interferencia espectral, es decir, las señales de un colorante en otro módulo óptico.

Sigue existiendo la necesidad de análisis y exactitud en los datos generados por los procesos de amplificación de ácidos nucleicos.

5

Sumario

10 En general, la invención se refiere a técnicas para mejorar la exactitud del análisis de datos generados por amplificación de ácidos nucleicos en un sistema que tiene un dispositivo de detección de fluorescencia, tal como un sistema para amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. En particular, las técnicas pueden minimizar un efecto de señales espectrales que pueden detectarse desde un colorante mediante un módulo óptico configurado para detectar señales espectrales desde un colorante diferente, un fenómeno denominado en este documento "interferencia espectral" o simplemente "interferencia".

15 En un modo de realización ejemplar, el sistema puede incluir cuatro módulos ópticos que proporcionan cuatro "canales" para la detección óptica de cuatro colorantes diferentes. Un sistema capaz de detectar múltiples especies diana puede denominarse sistema multiplex. Cada uno de estos cuatro módulos ópticos puede configurarse para excitar diferentes regiones de una muestra que contiene ácido nucleico amplificado en cualquier momento dado y recoger energía de luz fluorescente emitida a diferentes longitudes de onda desde los colorantes. En modos de realización que incluyen múltiples módulos ópticos, pueden interrogarse de forma sustancialmente simultánea múltiples reacciones paralelas que se producen dentro de una muestra.

20 Cada uno de los módulos ópticos puede optimizarse para la detección de un colorante fluorescente respectivo en una banda de longitud de onda diferenciada. En otras palabras, los módulos ópticos se pueden usar para interrogar múltiples reacciones paralelas a diferentes longitudes de onda. Las reacciones paralelas pueden, por ejemplo, ocurrir dentro de una única cámara de proceso (por ejemplo, pocillo) de un disco giratorio. Además, cada módulo óptico puede ser extraíble para cambiar las capacidades de detección del dispositivo.

30 La pluralidad de módulos ópticos se puede acoplar ópticamente a un único detector mediante un haz de fibras ópticas de múltiples patas. De esta manera, la multiplexación se puede lograr usando una pluralidad de módulos ópticos y un único detector, por ejemplo, un tubo fotomultiplicador. Los componentes ópticos en cada módulo óptico se pueden seleccionar para maximizar la sensibilidad y minimizar la cantidad de interferencia espectral, es decir, señales de transferencia de un colorante en un módulo óptico que está configurado para detectar señales espectrales de otro colorante. Los colorantes fluorescentes pueden espaciarse espectralmente estrechamente entre sí, y se pueden diferenciar mediante el uso de filtros ópticos para minimizar la transferencia de señal de un colorante a otro. Debido a las amplias bandas de absorción y emisión de los fluoróforos típicos, los filtros pueden reducir, pero no eliminar, la interferencia espectral. La interferencia espectral de una señal fuertemente amplificadora a menudo dará como resultado un crecimiento en un canal vecino y puede interpretarse incorrectamente como un crecimiento en un canal objetivo. Esto puede dar como resultado determinaciones de falsos positivos. Las técnicas descritas en el presente documento usan un conjunto de factores de corrección determinados a partir de un procedimiento de calibración para eliminar automáticamente las señales interferentes.

45 Las técnicas descritas en el presente documento se pueden aplicar para reducir o eliminar la interferencia espectral en la amplificación de ácidos nucleicos. En un modo de realización ejemplar, las técnicas descritas en el presente documento se pueden aplicar para reducir o eliminar la interferencia espectral en la amplificación multiplex de ácidos nucleicos en tiempo real. La interferencia espectral se produce debido a la superposición espectral de una sonda fluorescente (por ejemplo, colorante) en los canales de detección vecinos, y puede conducir a determinaciones de falsos positivos. De acuerdo con las técnicas de esta divulgación, se determina un conjunto de factores de corrección de la interferencia a partir de un proceso de calibración. Se describe un algoritmo que emplea el conjunto de factores de corrección para restar automáticamente la cantidad de señal de los canales vecinos en el canal de interés. Esto puede reducir o eliminar las determinaciones de falsos positivos.

55 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método que comprende realizar una amplificación de ácido nucleico de una muestra de ácido nucleico, en el que la amplificación de ácido nucleico se produce durante uno o más períodos de interrogación usando una sonda de detección y, a partir de la amplificación de ácido nucleico, adquiriendo datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente durante cada uno de los uno o más períodos de interrogación. El método también incluye, basándose en los datos de la amplificación, determinar un valor de corrección de la interferencia asociado a un vecino espectral a la sonda para reducir la interferencia espectral del vecino espectral, y aplicar el valor de corrección de la interferencia a los datos de amplificación recopilados a partir de la amplificación multiplex de ácidos nucleicos de las muestras de ácido nucleico.

65 En un modo de realización preferente, a partir de los datos de amplificación, se determina un valor de corrección de la interferencia que está asociado a un vecino espectral más cercano a la sonda para reducir la interferencia espectral del vecino espectral más cercano; y aplicar el valor de corrección de la interferencia a los datos de

amplificación recogidos a partir de la amplificación multiplex de ácidos nucleicos de muestras de ácido nucleico.

De forma alternativa, el método puede usar más de una sonda para realizar amplificaciones de ácido nucleico de una muestra de ácido nucleico durante uno o más periodos de interrogación, y se calcula más de un valor de corrección de la interferencia, en el que cada valor de corrección de la interferencia se asocia a un vecino espectral, tal como cualquier vecino espectral con pico de fluorescencia del colorante objetivo de detección y el colorante objetivo vecino separados por una distancia menor que una distancia umbral. Por ejemplo, cualquier vecino espectral con pico de fluorescencia del colorante objetivo de detección y el colorante objetivo vecino separados por una distancia menor que una distancia umbral.

En otro aspecto, un método comprende realizar una amplificación multiplex de ácidos nucleicos de una muestra de ácido nucleico, en el que la amplificación multiplex de ácidos nucleicos comprende una pluralidad de periodos de interrogación y, a partir de la amplificación de ácido nucleico, adquirir datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente durante cada uno de la pluralidad de periodos de interrogación. El método también comprende aplicar un factor de corrección de la interferencia a los datos de amplificación para generar datos de amplificación modificados en los que se reducen las señales de interferencia espectral de un vecino espectral, en el que el valor de corrección de la interferencia se obtiene a partir de la amplificación multiplex de ácidos nucleicos de una segunda muestra de ácido nucleico, y mostrar los datos de amplificación modificados.

En otro aspecto, un sistema de detección incluye un dispositivo de detección que comprende un motor para girar un disco que tiene una pluralidad de cámaras de proceso que contienen cada una muestra respectiva y uno o más colorantes fluorescentes, una pluralidad de módulos ópticos y un alojamiento que tiene una pluralidad de ubicaciones adaptadas para recibir los módulos ópticos. Cada uno de la pluralidad de módulos ópticos incluye un canal óptico que tiene una fuente de luz seleccionada para uno diferente de los colorantes y una lente para capturar luz fluorescente emitida desde el disco. El sistema también incluye un dispositivo de adquisición de datos acoplado al dispositivo de detección, en el que el dispositivo de adquisición de datos se configura para aplicar un valor de corrección de la interferencia para cada uno de la pluralidad de módulos ópticos para reducir la interferencia espectral asociada a un vecino espectral para ese módulo óptico. El valor de corrección de la interferencia se obtiene realizando un análisis basado en datos de amplificación de una amplificación de ácido nucleico de una muestra de ácido nucleico usando una sonda de detección, en el que la amplificación de ácido nucleico ocurre durante una pluralidad de periodos de interrogación, y en el que el análisis comprende adquirir los datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente durante cada uno de la pluralidad de periodos de interrogación, y determinar el valor de corrección de la interferencia asociado al vecino espectral basándose en los datos de amplificación.

En un modo de realización preferente, el valor de corrección de la interferencia se obtiene realizando un análisis basado en datos de amplificación de una amplificación de ácido nucleico de una muestra de ácido nucleico usando una sonda de detección, en el que la amplificación de ácido nucleico ocurre durante una pluralidad de periodos de interrogación, y en el que el análisis comprende adquirir los datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente durante cada uno de la pluralidad de periodos de interrogación, y determinar el valor de corrección de la interferencia asociado al vecino espectral basándose en los datos de amplificación.

En un aspecto adicional, un dispositivo de detección incluye un motor para girar un disco que tiene una pluralidad de cámaras de proceso que contienen cada una muestra respectiva y uno o más colorantes fluorescentes, una pluralidad de módulos ópticos y un alojamiento que tiene una pluralidad de ubicaciones adaptadas para recibir los módulos ópticos. Cada uno de los módulos ópticos incluye un canal óptico que tiene una fuente de luz seleccionada para uno diferente de los colorantes y una lente para capturar luz fluorescente emitida desde el disco. El dispositivo también incluye una unidad de control configurada para aplicar valores de corrección de la interferencia para cada uno de la pluralidad de módulos ópticos para reducir la interferencia espectral asociada a vecinos espectrales para ese módulo óptico. Los valores de corrección de la interferencia se obtienen realizando un análisis basado en datos de amplificación de una amplificación de ácido nucleico de una muestra de ácido nucleico usando una sonda de detección, en el que la amplificación de ácido nucleico ocurre durante una pluralidad de periodos de interrogación, y en el que el análisis comprende adquirir los datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente durante cada uno de la pluralidad de periodos de interrogación, y determinar un valor de corrección de la interferencia asociado a uno de los vecinos espectrales basándose en los datos de amplificación.

En otro aspecto más, un dispositivo incluye un módulo de control configurado para inicializar una amplificación de ácido nucleico de una primera muestra de ácido nucleico y recibir datos de una primera amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente durante cada uno de una primera pluralidad de periodos de interrogación. El dispositivo incluye un módulo de amplificación configurado para aplicar un valor de corrección de la interferencia a un módulo óptico para obtener datos de amplificación corregidos que tienen una interferencia espectral reducida asociada a un vecino espectral para ese módulo óptico. El valor de corrección de la interferencia se obtiene realizando un análisis basado en datos de una segunda amplificación de una amplificación de ácido nucleico de una segunda muestra de ácido nucleico usando una sonda de detección, en el que la amplificación de ácido nucleico ocurre durante una segunda pluralidad de periodos de interrogación, y en

5 el que el análisis comprende adquirir los datos de la segunda amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente durante cada uno de la segunda pluralidad de períodos de interrogación, y determinar un valor de corrección de la interferencia asociado al vecino espectral basándose en los datos de la segunda amplificación. El dispositivo incluye un módulo de interfaz configurado para actualizar una pantalla basada en los datos de amplificación corregidos.

10 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método que incluye realizar una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una muestra de ácido nucleico, en el que la amplificación por PCR ocurre durante una pluralidad de períodos de interrogación de la PCR usando una sonda de detección. A partir de la amplificación por PCR, se adquieren datos que indican una cantidad de ácido nucleico presente durante cada uno de la pluralidad de períodos de interrogación de la PCR. El método también incluye, basándose en los datos de la amplificación, determinar un valor de corrección de la interferencia asociado a un vecino espectral a la sonda para reducir la interferencia espectral del vecino espectral, y aplicar el valor de corrección de la interferencia a los datos de amplificación recopilados a partir de la amplificación por PCR multiplex de las muestras de ácido nucleico.

15 En un modo de realización preferente, a partir de los datos de amplificación, se determina un valor de corrección de la interferencia que está asociado a un vecino espectral más cercano a la sonda para reducir la interferencia espectral del vecino espectral más cercano, y el valor de corrección de la interferencia se aplica a los datos de amplificación recogidos a partir de la amplificación por PCR multiplex de muestras de ácido nucleico.

20 De forma alternativa, el método puede usar más de una sonda para realizar la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una muestra de ácido nucleico durante uno o más períodos de interrogación de la PCR y se calcula más de un valor de corrección de la interferencia, en el que cada valor de corrección de la interferencia se asocia a un vecino espectral. Por ejemplo, cualquier vecino espectral con pico de fluorescencia del colorante objetivo de detección y el colorante objetivo vecino separados por una distancia menor que una distancia umbral.

25 En otro aspecto, un método comprende realizar una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex de una muestra de ácido nucleico, en el que la amplificación por PCR multiplex comprende una pluralidad de períodos de interrogación de PCR y, a partir de la amplificación por PCR, adquirir datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente durante cada uno de la pluralidad de períodos de interrogación de la PCR. El método también comprende aplicar un factor de corrección de la interferencia a los datos de amplificación para generar datos de amplificación modificados en los que se reducen las señales de interferencia espectral de un vecino espectral más cercano, en el que el factor de corrección de la interferencia se obtiene a partir de la amplificación por PCR multiplex de una segunda muestra de ácido nucleico, y mostrar los datos de amplificación modificados.

30 "Período de interrogación" como se usa en el presente documento significa el punto temporal o unidad de tiempo en el que se produce y/o se mide la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana. Por ejemplo, en la PCR, un período de interrogación es un ciclo de amplificación térmica, mientras que en la TMA un período de interrogación es un período de tiempo, como minutos o segundos.

35 Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 es un diagrama de bloques que ilustra un modo de realización ejemplar de un dispositivo de detección de fluorescencia multiplex.

45 La figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra un módulo de detección ejemplar, que puede corresponder a cualquiera de una pluralidad de módulos de detección del dispositivo de detección de fluorescencia de la figura 1.

50 La figura 3 es un diagrama en perspectiva que ilustra una vista frontal de un conjunto ejemplar de módulos ópticos extraíbles dentro del alojamiento del dispositivo.

55 La figura 4 es un diagrama en perspectiva que ilustra el conjunto ejemplar de módulos ópticos extraíbles dentro del alojamiento del dispositivo.

60 La figura 5 es un diagrama en perspectiva que ilustra una vista lateral frontal de un conjunto ejemplar de módulos ópticos extraíbles que tienen un módulo extraído para dejar al descubierto un conector del módulo.

65 Las figuras 6A y 6B son diagramas en perspectiva que ilustran los componentes dentro de módulos ópticos extraíbles principales ejemplares.

Las figuras 7A y 7B son diagramas en perspectiva que ilustran los componentes dentro de módulos ópticos extraíbles suplementarios ejemplares.

5 La figura 8 es un diagrama de bloques que ilustra un modo de realización de ejemplo del dispositivo de detección de fluorescencia multiplex en más detalle.

La figura 9 es un diagrama de bloques de un único detector acoplado a cuatro fibras ópticas del haz de fibras ópticas.

10 La figura 10 es un diagrama de bloques funcional que ilustra un dispositivo de amplificación de datos de ejemplo.

La figura 11 es un diagrama de flujo que ilustra el funcionamiento ejemplar del dispositivo de detección de fluorescencia multiplex.

15 La figura 12 es un diagrama de flujo que ilustra un método ejemplar si se detecta luz y se muestrean datos del disco.

20 Las figuras 13 y 14 son gráficos que muestran los espectros de absorción y emisión de colorantes fluorescentes frecuentemente usados que pueden utilizarse para la PCR multiplex.

Las figuras 15A y 15B ilustran los datos brutos adquiridos de dos módulos de detección ejemplares con un único detector durante una amplificación por PCR.

25 La figura 16 es un gráfico que muestra los datos una vez ajustados para un desfase temporal.

Las figuras 17A y 17B muestran un límite de detección (LOD) para los datos recibidos de dos módulos de detección ejemplares.

30 La figura 18 es una captura de pantalla ejemplar de una interfaz de usuario de control de temperatura.

La figura 19 es una captura de pantalla ejemplar de una interfaz de usuario de control óptico.

35 La figura 20 es una captura de pantalla ejemplar de una interfaz de usuario de PCR en tiempo real.

La figura 21 es un gráfico que ilustra una curva de amplificación por PCR para una muestra de ácido nucleico de ejemplo.

40 La figura 22 es un gráfico que ilustra una curva estándar para una serie de dilución de ácido nucleico de ejemplo.

La figura 23 es una pantalla de interfaz de usuario de ejemplo presentada a un usuario por un dispositivo de amplificación de datos.

45 La figura 24 es un diagrama de flujo que ilustra un método de ejemplo para determinar valores de corrección de la interferencia espectral para un sistema de amplificación por PCR.

La figura 25 es un diagrama de flujo que ilustra una operación de ejemplo de un sistema de amplificación por PCR.

50 Las figuras 26A-26C son gráficos que ilustran curvas de amplificación basadas en trazas de datos de singleplex basados en una sonda FAM.

Las figuras 27A-27C son gráficos que ilustran curvas de amplificación basadas en trazas de datos de singleplex obtenidos a partir de una sonda JOE.

55 Las figuras 28A-28C son gráficos que ilustran curvas de amplificación basadas en trazas de datos de singleplex obtenidos a partir de una sonda TxRed.

60 Las figuras 29A-29C son gráficos que ilustran curvas de amplificación basadas en trazas de datos de singleplex obtenidos a partir de una sonda Cy5.

La figura 30 es una pantalla de interfaz de usuario de ejemplo presentada a un usuario por un dispositivo de adquisición de datos.

65 **Descripción detallada**

En general, la presente divulgación se refiere a técnicas para procesar datos de amplificación de ácidos nucleicos para reducir los efectos de la interferencia espectral. En un aspecto, la presente divulgación se refiere a aplicar la compensación de la interferencia espectral a datos de amplificación recogidos en la amplificación de ácido nucleico. En algunos aspectos, solo la interferencia debida a un vecino espectral no es tenida en cuenta por un algoritmo de compensación. Aunque la siguiente descripción se ejemplifica aplicando compensación de la interferencia a datos de amplificación por PCR en tiempo real, se entenderá que las técnicas descritas en el presente documento pueden aplicarse a datos recogidos por otra amplificación de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y similares.

La figura 1 es un diagrama de bloques que ilustra un modo de realización ejemplar de un sistema 9 de amplificación de ácido nucleico que incluye un dispositivo 21 de adquisición de datos y un dispositivo 10 de detección de fluorescencia multiplex. El sistema 9 recoge los datos de amplificación de al menos una muestra de ácido nucleico y analiza los datos de amplificación usando la corrección de la interferencia espectral basándose en las técnicas descritas en el presente documento. En el ejemplo ilustrado, el dispositivo 10 tiene cuatro módulos 16 ópticos que proporcionan cuatro "canales" para la detección óptica de cuatro colorantes diferentes. En particular, el dispositivo 10 tiene cuatro módulos 16 ópticos que excitan diferentes regiones de disco 13 giratorio en cualquier momento dado, y recogen energía de luz fluorescente emitida a diferentes longitudes de onda desde los colorantes. Como resultado, los módulos 16 se pueden usar para interrogar de forma sustancialmente simultánea múltiples reacciones paralelas que se producen dentro de la muestra 22. El sistema 9, capaz de detectar múltiples especies diana en la amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real, se puede denominar sistema multiplex. En otros modos de realización, se pueden interrogar de manera sustancialmente simultánea múltiples reacciones diferentes que se producen en diferentes cámaras del disco 13.

Las múltiples reacciones pueden producirse, por ejemplo, simultáneamente dentro de una única cámara de un disco 13 giratorio. Cada uno de los módulos 16 ópticos interroga a la muestra 22 y recoge energía de luz fluorescente a diferentes longitudes de onda a medida que el disco 13 gira. Por ejemplo, las fuentes de excitación dentro de los módulos 16 pueden activarse secuencialmente durante períodos suficientes para recoger datos en las longitudes de onda correspondientes durante cada período de interrogación. Es decir, un módulo 16A óptico puede activarse durante un período de tiempo para recoger datos en un primer intervalo de longitudes de onda seleccionadas para un primer colorante correspondiente a una primera reacción. La fuente de excitación puede entonces desactivarse, y una fuente de excitación dentro del módulo 16B puede activarse para interrogar a la muestra 22 en un segundo intervalo de longitudes de onda seleccionadas para un segundo colorante correspondiente a una segunda reacción. Este proceso continúa hasta que se han capturado los datos de todos los módulos 16 ópticos. En un modo de realización, cada una de las fuentes de excitación dentro de los módulos 16 ópticos se activa durante un período inicial de aproximadamente dos segundos para alcanzar el estado de equilibrio seguido por un período de interrogación que dura 10-50 rotaciones del disco 13. En otros modos de realización, las fuentes de excitación pueden secuenciarse durante períodos más cortos (por ejemplo, 1 o 2 milisegundos) o más largos.

En algunos modos de realización, se puede activar más de un módulo óptico simultáneamente para la interrogación simultánea de la muestra 22 sin detener la rotación del disco 13.

Aunque se ilustra una única muestra 22, el disco 13 puede contener una pluralidad de cámaras que contienen muestras. Los módulos 16 ópticos pueden interrogar algunas o todas las diferentes cámaras a diferentes longitudes de onda. En un modo de realización, el disco 13 incluye un espacio de 96 cámaras alrededor de una circunferencia del disco 13. Con un disco de 96 cámaras y cuatro módulos 16 ópticos, el dispositivo 10 puede ser capaz de adquirir datos de 384 especies diferentes. De esta forma, el sistema 10 puede ser capaz de adquirir datos de forma simultánea a partir de muestras que incluyen diferentes ácidos nucleicos y/o diferentes colorantes fluorescentes.

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

Como se ilustra en la figura 1, cada uno de los módulos 16 ópticos puede acoplarse a una pata de un haz 14 de fibra óptica. El haz 14 de fibra óptica proporciona un mecanismo flexible para la recogida de señales fluorescentes desde módulos 16 ópticos sin pérdida de sensibilidad. En general, un haz de fibra óptica comprende múltiples fibras ópticas dispuestas una al lado de la otra y unidas entre sí en los extremos y envueltas en una cubierta protectora flexible. De forma alternativa, el haz 14 de fibra óptica puede comprender un número menor de fibras multimodales diferenciadas de gran diámetro, de vidrio o plástico, que tienen un extremo común. Por ejemplo, para un dispositivo de cuatro módulos ópticos, el haz 16 de fibra óptica puede comprender cuatro fibras multimodales diferenciadas, teniendo cada una un diámetro del núcleo de 1 mm. El extremo común del haz contiene las cuatro fibras unidas entre sí. En este ejemplo, la apertura del detector 18 puede ser de 8 mm, que es

más que suficiente para acoplarse a las cuatro fibras.

En este ejemplo, el haz 14 de fibra óptica acopla los módulos 16 ópticos a un detector 18. Las fibras ópticas llevan la luz fluorescente recogida por los módulos 16 ópticos y entregan de forma efectiva la luz capturada al detector 18. En un modo de realización, el detector 18 es un tubo fotomultiplicador. En otro modo de realización, el detector puede incluir múltiples elementos fotomultiplicadores, uno para cada fibra óptica, dentro del único detector. En otros modos de realización, se pueden usar uno o más detectores en estado sólido.

El uso de un único detector 18 puede ser ventajoso porque permite el uso de un detector altamente sensible y posiblemente caro (por ejemplo, un fotomultiplicador), mientras se mantiene un coste mínimo porque solo se necesita usar un único detector. En el presente documento se analiza un único detector; sin embargo, se pueden incluir uno o más detectores para detectar un mayor número de colorantes. Por ejemplo, se pueden añadir al sistema cuatro módulos 16 ópticos adicionales y un segundo detector para permitir la detección de ocho longitudes de onda diferentes emitidas desde un disco. Un haz de fibra óptica ejemplar acoplado a un único detector para uso con un disco 13 giratorio se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006-0223172, titulada "MULTIPLEX FLUORESCENCE DETECTION DEVICE HAVING FIBER BUNDLE COUPLING MULTIPLE OPTICAL MODULES TO A COMMON DETECTOR" (Dispositivo de detección de fluorescencia multiplex con haz de fibras que acopla múltiples módulos ópticos a un detector común).

Los módulos 16 ópticos son extraíbles del dispositivo y fácilmente intercambiables con otros módulos ópticos que están optimizados para interrogación a diferentes longitudes de onda. Por ejemplo, los módulos 16 ópticos pueden estar físicamente montados dentro de las ubicaciones de un alojamiento de módulo. Cada uno de los módulos 16 ópticos puede insertarse fácilmente dentro de una ubicación respectiva del alojamiento a lo largo de guías (por ejemplo, ranuras empotradas) que coincidan con una o más marcas (por ejemplo, pasadores de guía) del módulo óptico. Cada módulo óptico incluye un puerto de salida óptico (mostrado en las figuras 6A y 7A) para el acoplamiento a una pata del haz 14 de fibra óptica. El puerto de salida óptica puede tener un extremo roscado acoplado a un conector roscado de la pata. De forma alternativa, se puede usar una forma de "conexión rápida" (por ejemplo, una conexión deslizable que tiene una junta tórica y un pasador de retención) que permite que el haz 14 de fibra óptica se acople de forma deslizable y se desenganche del puerto de salida óptica. Además, cada uno de los módulos 16 ópticos puede tener uno o más contactos eléctricos para acoplarse electrónicamente a una unidad 23 de control cuando está completamente insertado.

La arquitectura modular del dispositivo 10 permite que el dispositivo se adapte fácilmente a todos los colorantes fluorescentes utilizados en un entorno de amplificación dado, como la PCR multiplex. Otras químicas que se pueden usar en el dispositivo 10 incluyen Invader® (Third Wave, Madison, Wisconsin), amplificación mediada por transcripción (GenProbe, San Diego, California), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima marcado con fluorescencia (ELISA) o hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La arquitectura modular del dispositivo 10 puede proporcionar otra ventaja en que la sensibilidad de cada módulo 16 óptico puede optimizarse mediante la elección de la fuente de excitación correspondiente (no mostrada) y filtros de excitación y detección para un pequeño intervalo objetivo específico de longitudes de onda para excitar y detectar selectivamente un colorante correspondiente en la reacción multiplex.

A modo de ejemplo, el dispositivo 10 se ilustra en una disposición multiplex de 4 colores, pero se pueden usar más o menos canales con el haz 14 de fibra óptica apropiado. Este diseño modular permite al usuario actualizar fácilmente el dispositivo 10 en el campo simplemente añadiendo otro módulo 16 óptico a la base 20 e insertando una pata del haz 14 de fibra óptica en el nuevo módulo óptico. Los módulos 16 ópticos pueden tener una electrónica integrada que identifique los módulos ópticos y descargue los datos de calibración en un módulo de control interno u otros componentes electrónicos internos (por ejemplo, la unidad 23 de control) del dispositivo 10.

En el ejemplo de la figura 1, las muestras 22 están contenidas en cámaras 13 del disco, que está montado en una plataforma 25 giratoria bajo el control de la unidad 23 de control. Un disparador 27 del sensor de ranura proporciona una señal de salida utilizada por la unidad 23 de control y el dispositivo 21 de adquisición de datos para sincronizar la adquisición de datos con la posición de la cámara durante la rotación del disco. El disparador 27 del sensor de ranura puede ser un sensor mecánico u óptico. Por ejemplo, el sensor puede ser un láser que envía un haz de luz al disco 13 y la unidad 23 de control usa un sensor que detecta luz que pasa a través de una ranura en el disco 13 para localizar las cámaras en el disco. En otros modos de realización, el disco 13 puede incluir una pestaña, saliente o superficie reflectante además o en lugar de la ranura. El disparador 27 del sensor de ranura puede usar cualquier estructura física o mecanismo para localizar la posición radial del disco 13 a medida que gira. Los módulos 16 ópticos pueden estar físicamente montados encima de la plataforma 25 giratoria. Como resultado, los módulos 16 ópticos se superponen con cámaras diferentes en cualquier momento.

El dispositivo 21 de adquisición de datos proporciona un entorno operativo que tiene hardware y software para controlar el funcionamiento del dispositivo 10 de detección de fluorescencia, incluida la unidad 23 de control, los módulos 16A-16D ópticos y el detector 18, para detectar un colorante fluorescente en una muestra 22. En particular, un usuario interactúa con el dispositivo 21 de adquisición de datos para iniciar la amplificación de

ácidos nucleicos de una o más muestras contenidas dentro de una o más cámaras del disco 13 giratorio bajo el control de una unidad 23 de control. En respuesta, uno o más de los módulos 16 ópticos del dispositivo 10 de detección excita una o más regiones correspondientes del disco 13 giratorio y recoge la energía de luz fluorescente emitida desde un colorante contenido dentro de las cámaras. El disco 13 está montado en una
5 plataforma 25 giratoria. El módulo 19 de control controla la plataforma 15 giratoria acoplado un motor asociado a la plataforma 25 giratoria para hacer girar el disco 13 a una velocidad controlada.

El dispositivo 10 de detección también incluye un elemento de calentamiento (no mostrado) para controlar, por ejemplo, la temperatura de la muestra 22 en el disco 13. El elemento de calentamiento puede comprender una
10 bombilla halógena cilíndrica contenida dentro de un recinto reflectante. El recinto reflectante está configurado para enfocar la radiación de la bombilla sobre una sección radial del disco 13. En general, el área calentada del disco 13 se asemejaría a un anillo cuando el disco 13 gire. En este modo de realización, la forma del recinto reflectante puede ser una combinación de geometrías elípticas y esféricas que permiten un enfoque preciso. En otros modos de realización, el recinto reflectante puede tener una forma diferente o la bombilla puede irradiar
15 ampliamente un área mayor. En otros modos de realización, el recinto reflectante puede estar conformado para enfocar la radiación de la bombilla sobre una única área del disco 13, tal como una única cámara de proceso que contiene una muestra 22.

En algunos modos de realización, el elemento de calentamiento puede calentar aire y forzar el aire caliente sobre una o más muestras para modular la temperatura. Además, las muestras pueden calentarse directamente por el
20 disco. En este caso, el elemento de calentamiento puede estar situado en la plataforma 25 y acoplarse térmicamente al disco 13. La resistencia eléctrica dentro del elemento de calentamiento puede calentar una región seleccionada del disco según lo controlado por la unidad 23 de control. Por ejemplo, una región puede contener una o más cámaras, posiblemente todo el disco. Un elemento de calentamiento ejemplar para su uso
25 con el disco 13 giratorio se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007-0009382, titulada "HEATING ELEMENT FOR A ROTATING MULTIPLEX FLUORESCENCE DETECTION DEVICE" (Elemento de calefacción para un dispositivo de detección de fluorescencia multiplex).

De forma alternativa, o además, el dispositivo 10 también puede incluir un componente de enfriamiento (no
30 mostrado). Se incluye un ventilador en el dispositivo 10 para suministrar aire frío, es decir, aire a temperatura ambiente, al disco 13. El enfriamiento puede ser necesario para modular la temperatura de la muestra de manera apropiada y almacenar muestras después de que se haya completado un experimento. En otros modos de realización, el componente de enfriamiento puede incluir acoplamiento térmico entre la plataforma 25 y el disco 13, ya que la plataforma 25 puede reducir su temperatura cuando sea necesario. Por ejemplo, algunas muestras
35 biológicas pueden almacenarse a 4 grados Celsius para reducir la actividad enzimática o la desnaturalización de proteínas.

El dispositivo 10 de detección también puede ser capaz de controlar especies de reacción contenidas dentro de una cámara de proceso. Por ejemplo, puede ser beneficioso cargar algunas especies en una cámara de proceso
40 para generar una reacción y más tarde añadir otra especie a la muestra una vez que la primera reacción haya terminado. Se puede añadir una válvula localizadora de láser para controlar una posición de válvula que separa una cámara de retención interna de la cámara de proceso, controlando de este modo la adición de especies a la cámara durante la rotación del disco 13. Este dispositivo láser puede estar situado dentro de uno de los módulos 16 ópticos o separado de los módulos ópticos. Directamente debajo del láser, debajo del disco 13, puede haber
45 un sensor láser para posicionar el láser con respecto al disco 13.

En un modo de realización, el láser es un láser en el infrarrojo cercano (NIR) con al menos dos configuraciones de potencia. Con un ajuste de baja potencia, el sensor de posicionamiento del láser puede indicar que el láser está en posición sobre la válvula de la cámara al reconocer la luz del NIR a través de una ranura en el disco 13.
50 Una vez que el láser está en posición, la unidad 23 de control ordena al láser que genere una pequeña ráfaga de energía de alta potencia para calentar la válvula y abrirla. La válvula abierta puede permitir entonces que la muestra de fluido interna fluya desde la cámara interior hacia la cámara de proceso exterior y se realice una segunda reacción. En algunos modos de realización, el disco 13 puede contener una pluralidad de válvulas para generar una pluralidad de reacciones en secuencia. También se puede usar más de un conjunto de láser y sensor láser cuando se utilizan múltiples válvulas de cámara. En la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007-0009383, titulada "VALVE CONTROL SYSTEM FOR A ROTATING MULTIPLEX
55 FLUORESCENCE DETECTION DEVICE" (Sistema de control de válvulas para un dispositivo de detección de fluorescencia multiplex giratorio) se describe un sistema de control de válvula localizadora de láser ejemplar para uso con el disco 13 giratorio.

El dispositivo 21 de adquisición de datos puede recoger datos del dispositivo 10 para cada colorante, ya sea secuencialmente o en paralelo. En un modo de realización, el sistema 21 de adquisición de datos recoge los datos de los módulos 16 ópticos en secuencia, y corrige el solapamiento espacial mediante un retardo de activación para cada uno de los módulos ópticos medidos desde el disparador 27 del sensor de ranura.
60

Una aplicación para el dispositivo 10 es la PCR en tiempo real, pero las técnicas descritas en el presente
65

documento pueden extenderse a otras plataformas que utilizan detección de fluorescencia a múltiples longitudes de onda. El dispositivo 10 puede combinar termociclación rápida, utilizando el elemento de calentamiento, y microfluidica accionada centrífugamente para aislamiento, amplificación y detección de ácidos nucleicos. Al hacer uso de la detección de fluorescencia multiplex, pueden detectarse y analizarse en paralelo múltiples especies objetivo.

Para la PCR en tiempo real, la fluorescencia se usa para medir la cantidad de amplificación en una de tres técnicas generales. La primera técnica es el uso de un colorante, como Sybr® Green (Molecular Probes, Eugene, Oregon), cuya fluorescencia aumenta al unirse al ADN bicatenario. La segunda técnica usa sondas marcadas de forma fluorescente cuya fluorescencia cambia cuando se unen a la secuencia diana amplificada (sondas de hibridación, sondas en horquilla, etc.). Esta técnica es similar a usar un colorante de unión a ADN bicatenario, pero es más específica porque la sonda se unirá solo a una determinada sección de la secuencia diana. La tercera técnica es el uso de sondas de hidrólisis (Taqman™, Applied BioSystems, Foster City California), en las que la actividad exonucleasa de la enzima polimerasa escinde una molécula extintora de la sonda durante la fase de extensión de la PCR, haciéndola fluorescentemente activa.

En cada uno de los enfoques, la fluorescencia es linealmente proporcional a la concentración objetivo amplificada. El sistema 21 de adquisición de datos mide una señal de salida del detector 18 (o de forma alternativa, opcionalmente muestreada, almacenada y comunicada por la unidad 23 de control después del ciclo de PCR) para observar la amplificación casi en tiempo real. En la PCR multiplex, las múltiples dianas se marcan con diferentes colorantes que se miden de forma independiente. En términos generales, cada colorante tendrá diferentes espectros de absorbanza y emisión. Por esta razón, los módulos 16 ópticos pueden tener fuentes de excitación, lentes y filtros relacionados que se seleccionan ópticamente para la interrogación de la muestra 22 a diferentes longitudes de onda.

Las técnicas descritas en el presente documento se pueden aplicar para reducir o eliminar la interferencia espectral en la amplificación multiplex de ácidos nucleicos, tal como la PCR en tiempo real, realizada por el sistema 9. La interferencia espectral se produce debido a la superposición espectral de una sonda fluorescente (por ejemplo, colorante) en los canales de detección vecinos, y puede conducir a determinaciones de falsos positivos. De acuerdo con las técnicas de esta divulgación, se determina un conjunto de factores de corrección de la interferencia a partir de un proceso de calibración. El proceso de calibración se realiza usando datos reales de amplificación en tiempo real obtenidos con las sondas apropiadas en una serie de reacciones singleplex. Se exploran todos los canales para cada reacción aunque solo haya una diana presente, para cuantificar la cantidad de interferencia de esa sonda en los módulos vecinos. El procedimiento de calibración calcula un factor de corrección de la interferencia para cada módulo 16.

Aunque en general se describen en referencia a la PCR en tiempo real, las técnicas descritas en el presente documento se pueden aplicar a datos recogidos por otras amplificaciones de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, amplificación mediada por transcripción (TMA). Con respecto a la TMA, por ejemplo, se produce una reacción por TMA en tiempo real singleplex, y los datos de amplificación se recogen durante un período de interrogación de la TMA que abarca un período de tiempo, por ejemplo, 30-60 minutos. Los datos de amplificación pueden ser recogidos por cada uno de una pluralidad de canales de detección. Los datos de amplificación indican una cantidad de ácido nucleico presente en diferentes puntos a lo largo del período de interrogación. Se puede realizar una sustracción basal para cada canal, y se pueden determinar valores de corrección de la interferencia para cada canal, de una manera similar a la descrita anteriormente. Según esto, se pueden obtener valores de corrección de la interferencia para cada módulo. Los valores de corrección de la interferencia se pueden almacenar y aplicar a datos de amplificación adquiridos posteriormente para ajustar los datos.

Como se describe con más detalle a continuación, el sistema 9 se inicializa con los factores de corrección de la interferencia para cada módulo 16 y está configurado para ejecutar un algoritmo que emplea el conjunto de factores de corrección de la interferencia para sustraer automáticamente la cantidad de señal de los canales vecinos en el canal de interés. Esto puede reducir o eliminar las determinaciones de falsos positivos. Por ejemplo, en algunos modos de realización, el dispositivo 21 de adquisición de datos está configurado para aplicar el conjunto de factores de corrección de la interferencia a señales obtenidas por el dispositivo 10 de detección de fluorescencia multiplex. En otros modos de realización, la unidad 23 de control del dispositivo 10 de detección de fluorescencia multiplex está configurada para aplicar el conjunto de factores de corrección de la interferencia a las señales obtenidas. En cualquier caso, el sistema 9 puede configurarse con el conjunto de factores de corrección de la interferencia durante el proceso de fabricación. De forma alternativa, el sistema 9 puede configurarse con el conjunto de factores de corrección de la interferencia mediante la instalación de software por parte de un cliente.

El sistema 21 de adquisición de datos puede almacenar datos representativos de la señal o señales de salida durante cada período de interrogación como datos de amplificación en formato de matriz o tabla, en el que, por ejemplo, cada columna de una fila almacena el número de ciclo y la misma columna de una segunda fila almacena la intensidad de fluorescencia asociada.

Algunos ejemplos de sistemas adecuados, técnicas de construcción o materiales que pueden adaptarse para uso en conexión con la presente invención pueden describirse en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.507.575, titulada "MULTIPLEX FLUORESCENCE DETECTION DEVICE HAVING REMOVABLE OPTICAL MODULES" (Dispositivo de detección de fluorescencia multiplex con módulos ópticos extraíbles), comúnmente asignada, la patente de EE. UU. n.º 6.734.401 titulada "ENHANCED SAMPLE PROCESSING DEVICES SYSTEMS AND METHODS" (Sistemas y métodos de dispositivos de procesamiento de muestras mejorados), y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2002/0064885 titulada "SAMPLE PROCESSING DEVICES" (Dispositivos de procesamiento de muestras).

Otras construcciones de dispositivo utilizables pueden encontrarse, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007-0010007, titulada "SAMPLE PROCESSING DEVICE COMPRESSION SYSTEMS AND METHODS" (Sistemas y métodos de compresión de dispositivos de procesamiento de muestras); y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2002/0048533 titulada "SAMPLE PROCESSING DEVICES AND CARRIERS" (Dispositivos y vehículos de procesamiento de muestras). Otras posibles construcciones de dispositivo pueden encontrarse en la patente de EE. UU. n.º 6.627.159, titulada "CENTRIFUGAL FILLING OF SAMPLE PROCESSING DEVICES" (Carga centrífuga de dispositivos de procesamiento de muestras) (Bedingham et al.).

La figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra un módulo 16A óptico ejemplar, que puede corresponder a cualquiera de los módulos 16 ópticos de la figura 1. En este ejemplo, el módulo 16A óptico contiene una fuente de excitación de alta potencia, LED 30, una lente 32 de colimación, un filtro 34 de excitación, un filtro 36 dicróico, una lente 38 de enfoque, un filtro 40 de detección y una lente 42 para enfocar la fluorescencia en una pata del haz 14 de fibra óptica.

En consecuencia, la luz de excitación del LED 30 se colima por la lente 32 de colimación, se filtra 34 por el filtro de excitación, se transmite a través del filtro 36 dicróico y se enfoca en la muestra 22 mediante la lente 38 de enfoque. La fluorescencia resultante emitida por la muestra la recoge la misma lente 38 de enfoque, la refleja el filtro 36 dicróico, y la filtra 40 el filtro de detección antes de ser enfocada en una pata del haz 14 de fibra óptica. El haz 14 óptico transfiere a continuación la luz al detector 18.

El LED 30, la lente 32 de colimación, el filtro 34 de excitación, el filtro 36 dicróico, la lente 38 de enfoque, el filtro 40 de detección y la lente 42 se seleccionan en función de las bandas de absorción y emisión específicas del colorante multiplex con el que se utilizará el módulo 16A óptico. De esta manera, múltiples módulos 16 ópticos pueden configurarse y cargarse dentro del dispositivo 10 para actuar sobre diferentes colorantes.

Una ventaja de la arquitectura de detección multiplex modular descrita es la flexibilidad para optimizar la detección de una amplia variedad de colorantes. Posiblemente un usuario puede tener un banco de varios módulos ópticos diferentes que pueden conectarse al dispositivo 10 según sea necesario, de los cuales N pueden usarse en cualquier momento, en el que N es el número máximo de canales admitidos por el dispositivo. Por lo tanto, el dispositivo 10 y los módulos 16 ópticos se pueden usar con cualquier colorante fluorescente y método de detección de amplificación de ácido nucleico. Se puede usar un haz de fibra óptica mayor para sustentar un mayor número de canales de detección. Además, se pueden usar múltiples haces de fibra óptica con múltiples detectores. Por ejemplo, se pueden usar dos haces de fibra óptica de 4 patas con ocho módulos 16 ópticos y dos detectores 18.

La figura 3 es un diagrama en perspectiva que ilustra una vista frontal de un conjunto ejemplar de módulos ópticos extraíbles dentro del alojamiento del dispositivo. En el ejemplo de la figura 3, el dispositivo 10 incluye el brazo 44 de la base y el alojamiento 46 de módulos. El módulo 48 óptico principal, el módulo 52 óptico suplementario y el módulo 56 óptico suplementario están contenidos dentro del alojamiento 46 de módulos. Los módulos ópticos 48, 52 y 56 producen haces ópticos de salida 49, 53 y 57, respectivamente, que excitan secuencialmente diferentes cámaras de proceso del disco 13. En otras palabras, los haces de salida 49, 53 y 57 siguen la curvatura del disco 13 para excitar cada uno la misma posición radial del disco que contiene las cámaras de proceso. El disparador 27 del sensor de ranura incluye la fuente 31 de luz infrarroja que produce luz 35 que es detectada por el detector 33.

Cada uno de los módulos ópticos 48, 52 y 56 incluye una palanca de liberación respectiva 50, 54 o 58, respectivamente, para acoplarse al alojamiento 46 de módulos. Cada palanca de liberación puede proporcionar una desviación hacia arriba para acoplarse con un pestillo respectivo formado dentro del alojamiento 46 de módulos. Un técnico u otro usuario presiona las palancas de liberación 50, 54 o 58, respectivamente, para desbloquear y extraer el módulo óptico 48, 52 o 56 del alojamiento 46 de módulos. El lector 29 de códigos de barras incluye un láser 62 para identificar el disco 13.

El brazo 44 de la base se extiende desde el dispositivo 10 de detección y proporciona soporte para el alojamiento 46 de módulos y los módulos ópticos 48, 52 y 56. El alojamiento 46 de módulos puede montarse de forma segura sobre el brazo 44 de la base. El alojamiento 46 de módulos puede contener una ubicación adaptada para recibir

uno de los respectivos módulos ópticos 48, 52 y 56. Aunque se describe a modo de ejemplo con respecto al alojamiento 46 de módulos, el alojamiento 46 de módulos del dispositivo 10 de detección puede tener una pluralidad de ubicaciones para recibir los módulos ópticos 48, 52 y 56. En otras palabras, no es necesario usar un alojamiento separado para los módulos ópticos 48, 52 y 56.

5 Cada ubicación del alojamiento 46 de módulos puede contener una o más pistas o guías que ayudan a colocar correctamente el módulo óptico asociado dentro de la ubicación cuando un técnico u otro usuario inserta el módulo óptico. Estas guías pueden ubicarse a lo largo de la parte superior, inferior o lateral de cada ubicación. Cada uno de los módulos ópticos 48, 52 y 56 puede incluir guías o pistas que coincidan con las guías o pistas de las ubicaciones del alojamiento 46 de módulos. Por ejemplo, el alojamiento 46 de módulos puede tener guías sobresalientes que coinciden con guías empotradas en los módulos ópticos 48, 52 y 56.

10 En algunos modos de realización, el alojamiento 46 de módulos puede no encerrar completamente cada uno de los módulos ópticos 48, 52 y 56. Por ejemplo, el alojamiento 46 de módulos puede proporcionar puntos de montaje para fijar cada uno de los módulos ópticos 48, 52 y 56 al brazo 44 de la base, pero pueden quedar al descubierto partes o la totalidad de cada módulo óptico. En otro modo de realización, el alojamiento 46 de módulos puede encerrar completamente cada uno de los módulos ópticos 48, 52 y 56. Por ejemplo, el alojamiento 46 de módulos puede incluir una única puerta que se cierra sobre los módulos ópticos 48, 52 y 56, o una puerta respectiva para cada uno de los módulos. Este modo de realización puede ser apropiado para aplicaciones en las que los módulos rara vez se extraen o el dispositivo 10 de detección se somete a condiciones ambientales extremas.

15 Un técnico puede extraer fácilmente cualquiera de los módulos ópticos 48, 52 o 56, y puede hacerlo utilizando solo una mano. Por ejemplo, el técnico puede descansar su dedo índice debajo de un reborde moldeado situado debajo de la palanca 54 de liberación del módulo 52 óptico. El pulgar del técnico puede entonces presionar hacia abajo la palanca 54 de liberación para liberar el módulo 52 óptico del alojamiento 46 de módulos. Mientras agarra el módulo 52 óptico entre el pulgar y el dedo índice, el técnico puede tirar hacia atrás del módulo óptico para extraer el módulo óptico del dispositivo 10 de detección. Se pueden usar otros métodos para extraer cualquiera de los módulos ópticos 48, 52 o 56, incluidos métodos que utilizan la extracción con dos manos. La inserción de cualquiera de los módulos ópticos 48, 52 o 56 se puede realizar de forma inversa con una o dos manos.

20 En el ejemplo de la figura 3, los componentes de dos módulos ópticos se combinan para formar el módulo 48 óptico principal. El módulo 48 óptico principal puede contener fuentes de luz que producen dos longitudes de onda de luz diferentes y detectores para detectar cada longitud de onda de fluorescencia diferente de las muestras en el disco 13. Por lo tanto, el módulo 48 óptico principal puede conectarse a dos patas del haz 14 de fibra óptica. De esta manera, el módulo 48 óptico principal puede verse como un módulo óptico de doble canal que tiene dos canales de excitación óptica y recogida independientes. En algunos modos de realización, el módulo 48 óptico principal puede contener componentes ópticos para más de dos módulos ópticos. En otros casos, el alojamiento 46 de módulos contiene una pluralidad (por ejemplo, dos o más) de módulos ópticos de un solo canal, tales como módulos ópticos suplementarios 52 y 56.

25 Como se ilustra en la figura 3, el módulo 48 óptico principal también puede contener componentes para un sistema 51 de control de válvula de láser (situado 48 dentro del módulo óptico). El sistema 51 de control de válvula de láser detecta la ubicación del disco 13 mediante una pequeña ranura situada cerca del borde exterior del disco 13. Un detector (no mostrado) detecta la luz 55 láser de baja potencia para asignar la ubicación del disco 13 con respecto al motor que hace girar el disco. La unidad 23 de control usa la asignación para localizar válvulas (no mostradas) en el disco 13.

30 El sistema 51 de control de válvula de láser enfoca la luz 55 láser en las válvulas que separan las cámaras de retención hacia el centro del disco 13 de las cámaras de proceso cerca del borde exterior del disco 13. Cuando el contenido de las cámaras de retención va a moverse a las cámaras de proceso asociadas, el sistema 51 de control de válvula de láser aplica luz 55 láser para calentar una válvula que separa las cámaras, provocando que la válvula se abra y proporcione comunicación fluida entre las dos cámaras. En particular, una vez que la válvula está abierta, el contenido de la cámara de retención interior puede fluir hacia la cámara de proceso exterior a medida que el disco 13 está girando. El dispositivo 10 de detección puede entonces controlar la reacción posterior en la cámara de proceso. El contenido dentro de una cámara puede incluir sustancias en un estado líquido o sólido.

35 En algunos modos de realización, el sistema 51 de control de válvula de láser puede estar contenido dentro de un módulo óptico de un solo canal, por ejemplo, módulo 54 óptico suplementario o módulo 56 óptico suplementario. En otros modos de realización, el sistema 51 de control de válvula de láser puede estar montado en el dispositivo 10 de detección por separado de cualquiera de los módulos ópticos 48, 52 o 56. En este caso, el sistema 51 de control de válvula de láser puede ser extraíble y estar adaptado para acoplarse a una ubicación dentro del alojamiento 46 de módulos o un alojamiento diferente del dispositivo 10 de detección.

60 En el ejemplo de la figura 3, el disparador 27 del sensor de ranura está situado cerca de los módulos extraíbles,

a cada lado del disco 13. En un modo de realización, el disparador 27 del sensor de ranura contiene una fuente 31 de luz para emitir luz 35 infrarroja (IR). El detector 33 detecta la luz 35 IR cuando la ranura en el disco 13 permite que la luz pase a través del disco al detector 33. La unidad 23 de control puede usar esta información para sincronizar las ubicaciones del disco 13 mientras este gira con los datos de los módulos ópticos 48, 54 y 56.

5 En algunos modos de realización, el disparador 27 del sensor de ranura puede extenderse desde el brazo 44 de la base para alcanzar el borde exterior del disco 13 durante el funcionamiento del dispositivo 10. En otros modos de realización, se puede usar un detector mecánico para detectar la posición del disco 13.

10 El lector 29 de códigos de barras usa el láser 62 para leer un código de barras situado en el borde lateral del disco 13. El código de barras identifica el tipo de disco 13 para permitir el funcionamiento correcto del dispositivo 10. En algunos modos de realización, el código de barras puede identificar el disco real para ayudar al técnico a rastrear datos a muestras específicas desde múltiples discos 13.

15 Todos los componentes de la superficie de los módulos ópticos 48, 52 y 56 pueden construirse con un polímero, compuesto o aleación de metal. Por ejemplo, se puede usar poliuretano de alto peso molecular para formar los componentes de la superficie. En otros casos, se puede crear una estructura de aleación de aluminio o fibra de carbono. En cualquier caso, el material puede ser resistente al calor, la fatiga, el estrés y la corrosión. Como el dispositivo 10 de detección puede entrar en contacto con materiales biológicos, las estructuras pueden ser esterilizables en caso de que el contenido de la cámara se filtre desde el disco 13.

20 La figura 4 es un diagrama en perspectiva que ilustra el conjunto ejemplar de módulos ópticos extraíbles 48, 52 y 56 dentro del alojamiento 46 de módulos del dispositivo 10 de detección. En el ejemplo de la figura 4, el brazo 44 de la base soporta el lector 29 de códigos de barras así como los módulos ópticos extraíbles 48, 52 y 56 acoplados dentro del alojamiento 46 de módulos. El disco 13 está situado debajo de los módulos ópticos 48, 52 y 56 con las cámaras de proceso situadas debajo de una trayectoria óptica respectiva de cada uno de los módulos en diferentes momentos en el tiempo.

30 Dentro del alojamiento 46 de módulos, pueden verse las partes delanteras del módulo 56 suplementario y el módulo 48 óptico principal. El módulo 56 suplementario contiene un reborde 59 moldeado y una palanca 58 de liberación. Como se describió previamente, el reborde 59 moldeado se puede usar para agarrar el módulo 56 cuando se extrae o inserta el módulo en el alojamiento 46 de módulos. Todos los módulos ópticos 48, 52 y 56 pueden tener un reborde moldeado y una palanca de liberación respectivos, o se puede usar una única palanca de liberación para extraer todos los módulos ópticos. En algunos modos de realización, los módulos ópticos 48, 52 y 56 pueden contener un componente diferente para agarrar el módulo. Por ejemplo, cada uno de los módulos ópticos 48, 52 y 56 puede contener un mango para extraer el módulo respectivo en una dirección vertical u horizontal desde el alojamiento 46 de módulos.

40 La ubicación de los módulos ópticos 48, 52 y 56 dentro del alojamiento 46 de módulos puede ser fija para excitar por separado diferentes muestras dentro del disco 13 en cualquier momento particular en el tiempo. Por ejemplo, el módulo 48 óptico principal puede estar ubicado ligeramente más hacia el brazo 44 de la base que los módulos ópticos suplementarios 52 y 56, que están desplazados a una ubicación a cada lado del módulo principal. Además, los módulos ópticos 48, 52 y 56 pueden estar desplazados en una dirección horizontal (indicada por la flecha en la figura 4, en la que X es la distancia que los haces de luz exteriores están desplazados desde los haces de luz interiores) de modo que los haces de luz de excitación producidos por los módulos siguen la curvatura del disco 13. En esta disposición, los haces de luz producidos por los módulos ópticos 48, 52 y 56 recorren la misma trayectoria que el disco 13 al girar, excitando y recogiendo de este modo la luz de las cámaras de proceso situadas a lo largo de la trayectoria. En otros modos de realización, los módulos ópticos 48, 52 y 56 están alineados de manera que los haces de luz de excitación recorren diferentes trayectorias alrededor del disco 13 giratorio.

50 En este ejemplo, el brazo 44 de la base contiene una placa 66 de contactos eléctricos que se extiende dentro del alojamiento 46 de módulos. Dentro del alojamiento 46 de módulos, la placa 66 de contactos eléctricos puede contener contactos eléctricos para cada uno de los módulos ópticos 48, 52 y 56. La placa 66 de contactos eléctricos puede estar acoplada eléctricamente a la unidad 23 de control. En algunos modos de realización, cada uno de los módulos ópticos 48, 52 y 56 puede tener una placa de contactos eléctricos asociada separada que está conectada a la unidad 23 de control.

60 El acoplador 68 de fibra óptica acopla una pata 14 del haz de fibra óptica a un puerto de salida óptica del módulo 56 óptico. Aunque no se muestra, cada uno de los módulos ópticos 48, 52 y 56 incluye un puerto de salida óptica adaptado para acoplarse con un acoplador de fibra óptica respectivo montado en el alojamiento 46 de módulos. La conexión entre el acoplador 68 de fibra óptica y la pata del haz 14 de fibra óptica puede ser un bloqueo roscado de tornillo, cierre de presión o ajuste por fricción.

65 El lector 29 de códigos de barras produce una luz 64 láser para leer el código de barras del disco 13. La luz 64 láser sigue una trayectoria directa en la que interactúa con el borde exterior del disco 13. La luz 64 puede extenderse para cubrir una gran área del disco 13 a la vez. El lector 29 de códigos de barras lee el código de

barras en el disco 13 cuando el disco está girando a baja velocidad. En otros modos de realización, el lector 29 de códigos de barras puede leer el código de barras periódicamente durante el funcionamiento para asegurarse de que no se haya cargado un nuevo disco en el dispositivo 10. El lector 29 de códigos de barras puede detectar más de un código de barras en el disco 13 en otros modos de realización.

5 En algunos modos de realización, el brazo 44 de la base puede ser móvil con respecto al disco 13. En este caso, el brazo 44 de la base podría ser configurable para detectar muestras en discos de diferentes tamaños o muestras situadas dentro de un interior del disco 13. Por ejemplo, se puede usar un disco mayor que contenga más cámaras de proceso o cámaras de proceso mayores moviendo el brazo 44 de la base más lejos del centro del disco 13. El alojamiento 46 de módulos también puede tener una posición configurable para cada uno de los módulos ópticos 48, 52 o 56, de modo que cada módulo puede moverse a una o más trayectorias circulares de las cámaras de proceso alrededor del disco 13.

15 La figura 5 es un diagrama en perspectiva que ilustra una vista lateral frontal de un conjunto ejemplar de módulos ópticos extraíbles que tienen un módulo extraído para dejar al descubierto un conector del módulo. En particular, el alojamiento 46 de módulos no se muestra en la figura 5, y el módulo 56 óptico ha sido extraído para dejar al descubierto los módulos ópticos 52 y 48 junto con las conexiones para el módulo 56 extraído.

20 La palanca 58 de liberación (figura 3) del módulo 56 óptico se fija de forma segura al poste 69 de fijación montado en el brazo 44 de la base. En este ejemplo, el poste 69 de fijación se extiende en el interior del módulo 56 óptico y se acopla para liberar la palanca 58. En otros modos de realización, se pueden usar otros mecanismos de fijación para fijar el módulo 56 óptico al brazo 44 de la base, tal como un tornillo o dispositivo de fijación por presión.

25 El brazo 44 de la base proporciona dos conexiones operativas diferentes dentro del alojamiento 46 de módulos para recibir y acoplar el módulo 56 óptico, una vez insertado. En particular, el brazo 44 de la base proporciona una placa 66 de contactos eléctricos, que incluye conexiones 70 eléctricas para el acoplamiento a los contactos eléctricos (no mostrados) contenidos dentro del módulo 56 óptico. Las conexiones 70 eléctricas permiten que la unidad 23 de control se comuniquen con los componentes eléctricos dentro del módulo 56. Por ejemplo, el módulo 30 56 puede incluir circuitos eléctricos, hardware, firmware o cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, los componentes eléctricos internos pueden almacenar y enviar a la unidad 23 de control información de identificación única, tal como un número de serie. De forma alternativa, o además, los componentes eléctricos pueden proporcionar información que describa las características específicas de los componentes ópticos contenidos dentro del módulo 56 extraíble. Por ejemplo, los componentes eléctricos pueden incluir memoria programable de solo lectura (PROM), memoria flash u otro medio de almacenamiento interno o extraíble. Otros 35 modos de realización pueden incluir un conjunto de resistencias, un circuito o un procesador incrustado para emitir una firma única de módulos ópticos 48, 52 o 56 para controlar la unidad 23. En otro ejemplo, el módulo 56 óptico puede incluir una fuente de láser y otros componentes que forman parte de un sistema de control de válvula de láser, es decir, el sistema 51 de control de válvula de láser.

40 La placa 66 de contactos eléctricos puede ser extraída y reemplazada por otra versión asociada a un módulo óptico extraíble diferente. Esta opción puede admitir actualizaciones en la capacidad del dispositivo. En otros modos de realización, las conexiones 70 pueden contener más o menos pines de conexión.

45 Además, el brazo 44 de la base y el alojamiento 46 de módulos proporcionan un canal 72 óptico dentro de la ubicación para recibir el módulo 56 óptico. El canal 72 óptico está conectado al acoplador 68 de fibra óptica (figura 4) que está en contacto con una pata del haz 14 de fibra óptica. El canal 72 óptico se inserta en una ubicación dentro del módulo 56 óptico. La luz capturada por el módulo 56 óptico puede dirigirse a través del canal 72 óptico, el acoplador 68 de fibra óptica y el haz 15 de fibra óptica al detector. Los accesorios entre estas 50 conexiones pueden estar apretados para garantizar que la luz no escape o entre en la trayectoria óptica.

En algunos modos de realización, las conexiones al módulo 56 óptico pueden disponerse en una configuración diferente. Por ejemplo, las conexiones pueden estar situadas en otra posición para aceptar 56 el módulo óptico desde otra dirección. En otros modos de realización, las conexiones eléctricas pueden estar situadas en un lado del módulo 56 óptico mientras que una conexión óptica está situada en una segunda superficie del módulo 56. 55 En cualquier caso, las conexiones eléctricas y ópticas situadas dentro de la ubicación del alojamiento 46 de módulos acomodan un módulo óptico extraíble, es decir, el módulo 56 óptico en este ejemplo.

60 Las conexiones ópticas y eléctricas del módulo 56 descrito en la figura 5 se puede usar con cualquier módulo, incluidos los módulos ópticos 48 y 52. Además, las conexiones para cada módulo óptico pueden no ser idénticas. Dado que las conexiones pueden modificarse para acoplarse con un módulo óptico extraíble deseado, las conexiones utilizadas por cualquier módulo óptico particular insertado dentro de una ubicación particular del alojamiento 46 de módulos pueden variar en cualquier momento.

65 La figura 6A es un diagrama en perspectiva que ilustra los componentes dentro de un módulo 48A óptico principal extraíble. En el ejemplo de la figura 6A, el módulo 48A óptico principal incluye una palanca 50 de

liberación, un pasador 51 de pivote y un pestillo 74. El alojamiento 78 interno separa cada lado del módulo 48A y contiene una almohadilla 80 de contactos eléctricos conectada a una cinta 81. Los componentes ópticos incluyen el LED 82, la lente 84 de colimación, el filtro 86 de excitación, el filtro 88 dicroico, la lente 90 de enfoque, el filtro 92 de detección y la lente 94. El puerto 17 de salida óptica se acopla a una pata del haz 14 de fibra óptica. Un conjunto separado de componentes ópticos para un segundo canal óptico (no mostrado) está situado en el otro lado del alojamiento 78 interno. Además, el módulo 48A principal incluye el conector 96, el diodo 98 láser y la lente 100 de enfoque como parte de un sistema 51 de control de válvula de láser controlado por la unidad 23 de control.

La palanca 50 de liberación está unida al módulo 48A óptico por un pasador 61 de pivote. El pasador 61 de pivote permite que la palanca 50 de liberación gire alrededor del eje del pasador. Cuando se presiona 50 la palanca de liberación, el brazo 63 gira en sentido antihorario para elevar el pestillo 74. Una vez que se levanta el pestillo 74, el módulo 48A óptico puede estar libre para extraerlo del alojamiento 46 de módulos. Puede haber un resorte u otro mecanismo que mantenga una fuerza de desviación contra la palanca 50 de liberación para mantener el pestillo 74 en una posición bajada. En algunos modos de realización, se puede incluir un resorte alrededor del pasador 61 de pivote para proporcionar un brazo de momento que mantenga el pestillo 74 en la posición bajada, o trabada. En otros modos de realización, otros mecanismos de montaje se pueden añadir o utilizar en lugar de la palanca descrita. Por ejemplo, el módulo 48A óptico se puede unir al alojamiento 46 de módulos con uno o más tornillos o pasadores.

La placa 76 de montaje puede instalarse dentro del módulo 48A óptico para unir la cinta 81 de comunicación y el LED 82. La cinta 81 está conectada a la almohadilla 80 de contactos eléctricos y proporciona una conexión entre la almohadilla y los componentes eléctricos dentro del módulo 48A óptico. La almohadilla 80 de contactos y la cinta 81 pueden llevar la información requerida para ambos lados del módulo 48A óptico principal, incluyendo el sistema 51 de control de válvula de láser y cualquier memoria interna u otro medio de almacenamiento. La cinta 81 puede ser flexible para entretelado dentro del módulo 48A óptico. La cinta 81 puede contener una pluralidad de cables eléctricamente conductores para comunicar señales entre los componentes eléctricos y la unidad 23 de control y/o para suministrar potencia a los componentes eléctricos. En algunos modos de realización, cada componente eléctrico puede tener un cable separado que conecte el componente con la unidad 23 de control. Un técnico puede necesitar desconectar un cable o circuito flexible del alojamiento 46 de módulos cuando extraiga el módulo 48A óptico del alojamiento.

En algunos modos de realización, el módulo 48A óptico puede contener un detector para detectar luz del disco 13 y componentes electrónicos para procesar y almacenar los datos. La electrónica puede contener un circuito de telemetría para transmitir de manera inalámbrica datos que representen la luz detectada a la unidad 23 de control. La comunicación inalámbrica puede realizarse mediante luz infrarroja, radiofrecuencia, Bluetooth u otra técnica de telemetría. El módulo 48A óptico también puede incluir una batería para alimentar la electrónica, que puede ser recargable por la unidad 23 de control.

El LED 82 está fijado a la placa 76 de montaje y acoplado eléctricamente a la cinta 81. El LED 82 produce una luz 49 de excitación de una longitud de onda predeterminada para excitar la muestra 22. Después de que la luz 49 sale del LED 82, la luz es expandida por la lente 84 de colimación antes de que la luz entre en el filtro 86 de excitación. La luz 49 de una banda de longitud de onda pasa por el filtro 88 dicroico y se enfoca en una muestra mediante la lente 90 de enfoque. La luz 49 excita la muestra y la fluorescencia es recogida por la lente 90 de enfoque y entregada al filtro 92 de detección por el filtro 88 dicroico. La banda de longitud de onda resultante de la luz es recogida por la lente 94 y entregada al puerto 17 de salida óptica en el que la luz fluorescente recogida entra en una pata del haz 14 de fibra óptica para su transporte al detector 18.

El alojamiento 78 interno puede soportar todos los componentes incluidos en la excitación de la muestra y la detección de luz fluorescente emitida por la muestra para una longitud de onda seleccionada. En el otro lado del alojamiento 78 interno, se puede incluir una configuración similar de componentes ópticos para producir luz de una longitud de onda diferente y detectar la correspondiente longitud de onda fluorescente diferente. La separación de cada lado puede eliminar la contaminación lumínica de un lado que entra en el canal óptico del otro lado.

Alojados parcialmente entre cada lado del módulo 48A pueden estar los componentes del sistema 51 de control de válvula de láser, incluyen el conector 96, el diodo 98 láser y la lente 100 de enfoque. El alojamiento 78 interno puede proporcionar soporte físico para estos componentes. La cinta 81 está conectada al conector 96 para comunicar señales de accionamiento y potencia a la fuente de láser. El diodo 98 láser está conectado al conector 96 y produce la energía 55 de láser utilizada para abrir válvulas en el disco 13. El diodo 98 láser entrega esta luz en el infrarrojo cercano (NIR) a la lente 100 de enfoque para dirigir la energía 55 de láser a válvulas específicas en el disco 13. Se puede situar un sensor NIR debajo del disco 13 para localizar válvulas particulares que necesiten abrirse. En otros modos de realización, estos componentes pueden alojarse por separado de los componentes ópticos.

En algunos modos de realización, la lente 98 de emisión y la lente 100 de enfoque del sistema 51 de control de

válvula de láser pueden estar contenidas dentro de un módulo óptico de un único canal, tal como un módulo óptico suplementario 52 y 56 (figura 3).

5 La figura 6B es un diagrama en perspectiva que ilustra los componentes dentro de un módulo óptico diferente sustancialmente similar a la figura 6A. El módulo 48B óptico incluye muchos de los mismos componentes que el módulo 48A óptico. Las diferencias incluyen una tuerca 85, un circuito 87 flexible y un conector 89 de circuito flexible.

10 El módulo 48B óptico no requiere un mecanismo de retención para acoplarse al alojamiento 46 de módulos. De forma alternativa, la tuerca 85 se enrosca y se engancha mediante un perno roscado correspondiente fijado a través del alojamiento 46 de módulos. Una vez apretado, el módulo 48B óptico se fija de forma segura al dispositivo 10 de detección. En otros modos de realización, se puede usar un dispositivo de sujeción diferente. Por ejemplo, un pasador o pista puede bloquear el módulo 48B óptico en su lugar.

15 El circuito 87 flexible proporciona la conexión eléctrica entre los componentes del módulo 48B óptico con la unidad 23 de control. El circuito 87 flexible es flexible para moverse entre múltiples ubicaciones. El conector 89 de circuito flexible está acoplado al circuito 87 flexible y proporciona una conexión segura entre el circuito 87 flexible y el módulo 48B óptico. El conector 89 de circuito flexible debe estar desconectado para extraer por completo el módulo 48B óptico del alojamiento 46 de módulos.

20 La figura 7A es un diagrama en perspectiva que ilustra los componentes dentro de un módulo óptico suplementario ejemplar que puede extraerse de o insertarse en el dispositivo 10 de detección fácilmente. En el ejemplo de la figura 7A, el módulo 56A óptico incluye una palanca 58 de liberación, un pasador 59 de pivote y el pestillo 102, similar al módulo 48A óptico principal. El módulo 56A óptico también incluye una almohadilla 106 de contactos eléctricos conectada a una cinta 107. La cinta 107 también se puede conectar a una placa 104 de montaje. Similar al módulo 48A óptico principal, los componentes ópticos incluyen un LED 108, una lente 110 de colimación, un filtro 112 de excitación, un filtro 114 dicróico, una lente 116 de enfoque, un filtro 118 de detección y una lente 120. El puerto 19 de salida óptica se acopla a una pata del haz 14 de fibra óptica.

30 La palanca 58 de liberación está unida al módulo 56A óptico por un pasador 65 de pivote. El pasador 65 de pivote permite que la palanca de liberación gire alrededor del eje del pasador. Cuando se presiona 58 la palanca de liberación, el brazo 67 gira en sentido antihorario para elevar el pestillo 102. Una vez que se levanta el pestillo 102, el módulo 56A óptico puede estar libre para extraerlo del alojamiento 46 de módulos. Puede haber un resorte u otro mecanismo que mantenga una fuerza de desviación contra la palanca 58 de liberación para mantener el pestillo 102 en una posición bajada. De forma alternativa, un resorte puede estar situado sobre el pestillo 102. En algunos modos de realización, se puede incluir un resorte alrededor del pasador 65 de pivote para proporcionar un brazo de momento que mantenga el pestillo 102 en la posición bajada, o trabada. En otros modos de realización, otros mecanismos de montaje se pueden añadir o utilizar en lugar de la palanca descrita. Por ejemplo, el módulo 56A óptico se puede unir al alojamiento 46 de módulos con uno o más tornillos o pasadores.

45 La placa 104 de montaje puede instalarse dentro del módulo 56A óptico para unir la cinta 107 de comunicación y el LED 108. La cinta 107 está conectada a la almohadilla 106 de contactos eléctricos y proporciona una conexión entre la almohadilla y los componentes eléctricos dentro del módulo 56A óptico. La almohadilla 106 de contactos y la cinta 107 pueden llevar la información requerida para hacer funcionar los componentes ópticos. La cinta 107 puede ser flexible para entretrejo dentro del módulo 56A óptico. La cinta 107 puede contener una pluralidad de cables eléctricamente conductores para comunicar señales entre los componentes y la unidad 23 de control y/o suministrar potencia a los componentes eléctricos. En algunos modos de realización, cada componente eléctrico puede tener un cable separado que conecte el componente con la unidad 23 de control. Un técnico puede necesitar desconectar un cable o circuito flexible del alojamiento 46 de módulos cuando extraiga el módulo 56A óptico del alojamiento.

50 En algunos modos de realización, el módulo 56A óptico puede contener un detector para detectar luz del disco 13 y componentes electrónicos para procesar y almacenar los datos. La electrónica puede contener un circuito de telemetría para transmitir de manera inalámbrica datos que representen la luz detectada a la unidad 23 de control. La comunicación inalámbrica puede realizarse mediante luz infrarroja, radiofrecuencia, Bluetooth u otra técnica de telemetría. El módulo 56A óptico también puede incluir una batería para alimentar la electrónica, que puede ser recargable por la unidad 23 de control.

60 El LED 108 está fijado a la placa 104 de montaje y acoplado eléctricamente a la cinta 107. El LED 108 produce una luz 101 de excitación de una longitud de onda predeterminada para excitar la muestra 22. Después de que la luz 101 sale del LED 108, la luz es expandida por la lente 110 de colimación antes de que la luz entre en el filtro 112 de excitación. La luz 101 de una banda de longitud de onda pasa por el filtro 114 dicróico y se enfoca en una muestra mediante la lente 116 de enfoque. La luz 101 excita la muestra y la fluorescencia es recogida por la lente 116 de enfoque y entregada al filtro 118 de detección por el filtro 114 dicróico. La banda de longitud de onda resultante de la luz es recogida por la lente 120 y entregada al puerto 19 de salida óptica en el que la luz

fluorescente recogida entra en una pata del haz 14 de fibra óptica para su transporte al detector 18.

El módulo 56A óptico suplementario también puede contener los componentes del sistema 51 de control de válvula de láser. El sistema 51 de control de válvula de láser puede ser el único sistema utilizado dentro del dispositivo 10 o uno de una pluralidad de sistemas de control de válvula de láser. Los componentes usados para este sistema pueden ser similares a los componentes descritos en el módulo 48A óptico de la figura 6A.

Los componentes del módulo 56A óptico suplementario pueden ser similares a cualquier módulo óptico suplementario o a cualquier módulo óptico utilizado para emitir y detectar una banda de longitud de onda de la luz. En algunos modos de realización, los componentes pueden alterarse en la configuración para acomodarse a diferentes aplicaciones experimentales. Por ejemplo, cualquier módulo óptico se puede modificar para insertarlo desde una dirección diferente o para colocarlo dentro del dispositivo en una posición diferente con respecto al disco 13. En cualquier caso, los módulos ópticos pueden ser extraíbles para proporcionar flexibilidad de modificación al dispositivo 10.

La figura 7B es un diagrama en perspectiva que ilustra los componentes dentro de un módulo óptico suplementario diferente sustancialmente similar a la figura 7A. El módulo 56B óptico incluye muchos de los mismos componentes que el módulo 56A óptico. Las diferencias incluyen una tuerca 91, un circuito 93 flexible y un conector 95 de circuito flexible.

El módulo 56B óptico no requiere un mecanismo de retención para acoplarse al alojamiento 46 de módulos. De forma alternativa, la tuerca 91 se enrosca y se engancha mediante un perno roscado correspondiente fijado a través del alojamiento 46 de módulos. Una vez apretado, el módulo 56B óptico se fija de forma segura al dispositivo 10 de detección. En otros modos de realización, se puede usar un dispositivo de sujeción diferente. Por ejemplo, un pasador o pista puede bloquear el módulo 56B óptico en su lugar.

El circuito 93 flexible proporciona la conexión eléctrica entre los componentes del módulo 56B óptico con la unidad 23 de control. El circuito 93 flexible es flexible para moverse entre múltiples ubicaciones. El conector 95 de circuito flexible está acoplado al circuito 93 flexible y proporciona una conexión segura entre el circuito 93 flexible y el módulo 56B óptico. El conector 95 de circuito flexible debe estar desconectado para extraer por completo el módulo 56B óptico del alojamiento 46 de módulos.

La figura 8 es un diagrama de bloques funcional de un modo de realización ejemplar del dispositivo 10 de detección de fluorescencia multiplex. En particular, la figura 8 indica las conexiones eléctricas entre los componentes del dispositivo y las trayectorias generales de la luz a través de los componentes. En el ejemplo de la figura 8, el dispositivo 10 incluye al menos un procesador 122 u otra lógica de control, una memoria 124, un motor 126 de disco, una fuente 30 de luz, un filtro 34 de excitación, una lente 38, un filtro 40 de detección, una lente 42 colectora, un detector 18, un disparador 27 del sensor de ranura, una interfaz 130 de comunicación, un elemento 134 de calentamiento, un láser 136 y una fuente 132 de alimentación. Como se muestra en la figura 3, la lente 38 y la lente 42 colectora no necesitan estar conectadas eléctricamente a otro componente. Además, la fuente 30 de luz, los filtros 34 y 40, la lente 38 y la lente 42 colectora son representativos de un módulo 16 óptico. Aunque no se ilustra en la figura 8, el dispositivo 10 puede contener módulos 16 ópticos adicionales, como se describió anteriormente. En ese caso, cada módulo óptico adicional puede incluir componentes dispuestos de forma sustancialmente similar a los mostrados en la figura 8.

La luz sigue cierta trayectoria a través de varios componentes en la figura 8. Una vez que la luz es emitida por la fuente 30 de luz, entra en el filtro 34 de excitación y sale como luz de una longitud de onda diferenciada. A continuación, pasa a través de la lente 38, desde donde sale del dispositivo 10 de detección y excita la muestra 22 dentro de una cámara de proceso (no mostrada). La muestra 22 responde mediante fluorescencia a una longitud de onda diferente, en ese momento esta luz fluorescente entra en la lente 38 y se filtra mediante el filtro 40 de detección. El filtro 40 elimina la luz de fondo de las longitudes de onda fuera de la fluorescencia deseada de la muestra 22. La luz restante se envía a través de la lente 42 colectora y entra en una pata del haz 14 de fibra óptica antes de ser detectada por el detector 18. El detector 18 amplifica posteriormente la señal de luz recibida.

El procesador 122, la memoria 124 y la interfaz 130 de comunicación pueden ser parte de la unidad 23 de control. El procesador 122 controla el motor 126 de disco para girar o hacer girar el disco 13 según sea necesario para recoger información de fluorescencia o mover fluido a través del disco 13. El procesador 122 puede usar la información de posición del disco recibida desde el disparador 27 del sensor de ranura para identificar la ubicación de las cámaras en el disco 13 durante la rotación y sincronizar la adquisición de los datos de fluorescencia recibidos desde el disco 13.

El procesador 122 también puede controlar cuando se enciende y se apaga la fuente 30 de luz dentro del módulo 16 óptico. En algunos modos de realización, el procesador 122 controla el filtro 34 de excitación y el filtro 40 de detección. Dependiendo de la muestra que se ilumine, el procesador 122 puede cambiar el filtro para permitir que una longitud de onda diferente de la luz de excitación alcance la muestra o que una longitud de onda de

fluorescencia diferente alcance la lente 42 colectora. En algunos modos de realización, uno o ambos filtros pueden optimizarse para la fuente 30 de luz del módulo 16 óptico particular y no pueden cambiarse por el procesador 122.

5 La lente 42 colectora está acoplada a una pata 14 del haz de fibras que proporciona una trayectoria óptica para la luz desde la lente colectora hasta el detector 18. El procesador 122 puede controlar el funcionamiento del detector 18. Aunque el detector 18 puede detectar constantemente toda la luz, algunos modos de realización pueden utilizar otros modos de adquisición. El procesador 122 puede determinar cuándo el detector 18 recoge datos y puede establecer programáticamente otros parámetros de configuración del detector 18. En un modo de
10 realización, el detector 18 es un tubo fotomultiplicador que captura información de fluorescencia de la luz proporcionada por la lente 42 colectora. En respuesta, el detector 18 produce una señal 128 de salida (por ejemplo, una señal de salida analógica) representativa de la luz recibida. Aunque no se muestra en la figura 8, el detector 18 puede recibir simultáneamente luz desde otros módulos 16 ópticos del dispositivo 10. En ese caso, la señal 128 de salida representa eléctricamente una combinación de la entrada óptica recibida por el detector 18
15 desde los diversos módulos 16 ópticos.

El procesador 122 también puede controlar el flujo de datos desde el dispositivo 10. Los datos tales como la fluorescencia muestreada desde el detector 18, la temperatura de las muestras del elemento 134 de calentamiento y los sensores relacionados, y la información de rotación del disco pueden almacenarse en la
20 memoria 124 para su análisis. El procesador 122 puede comprender uno o más de un microprocesador, un procesador de señal digital (DSP), un circuito integrado de aplicación específica (ASIC), una matriz de puertas programables (FPGA), u otro circuito lógico digital. Además, el procesador 122 proporciona un entorno operativo para firmware, software o combinaciones de los mismos, almacenados en un medio legible por ordenador, tal como la memoria 124.

25 La memoria 124 puede incluir una o más memorias para almacenar una variedad de información. Por ejemplo, una memoria puede contener parámetros de configuración específicos, instrucciones ejecutables, y una puede contener datos recopilados. Por lo tanto, el procesador 122 puede usar datos almacenados en la memoria 124 para controlar el funcionamiento y la calibración del dispositivo. La memoria 124 puede incluir una o más de una
30 memoria de acceso aleatorio (RAM), memoria de solo lectura (ROM), ROM programable y borrable electrónicamente (EEPROM), memoria flash o similar.

El procesador 122 puede controlar adicionalmente el elemento 134 de calentamiento. Dependiendo de las instrucciones contenidas en la memoria 124, el elemento 134 de calentamiento puede accionarse selectivamente
35 para controlar la temperatura de una o más cámaras según los perfiles de calentamiento deseados. En general, el elemento de calentamiento calienta una sección radial del disco 13 a medida que el disco gira. El elemento 134 de calentamiento puede comprender una bombilla de halógeno y un reflector para enfocar la energía de calentamiento en un área específica del disco 13. En otros modos de realización, el elemento 134 de calentamiento puede calentar una o más cámaras secuencialmente. Este modo de realización requeriría que el
40 disco 13 estuviera inmóvil mientras se calienta una cámara. En cualquier modo de realización, el elemento 134 de calentamiento se puede encender y apagar de forma extremadamente rápida según sea necesario.

El láser 136 se usa para controlar la apertura de la válvula que permite que el contenido de una cámara de retención fluya a otra cámara en el disco 13, por ejemplo, un pocillo de reacción o cámara de proceso. El
45 procesador 122 y el hardware de soporte accionan el láser 136 para abrir selectivamente válvulas específicas contenidas en el disco 13. El procesador 122 puede interactuar con un sensor de láser debajo del disco 13 para determinar la posición del láser con relación a la válvula deseada. Cuando está en posición, el procesador 122 envía señales para dirigir el láser 136 para producir una ráfaga de energía dirigida a la válvula. En algunos casos, la ráfaga puede durar aproximadamente 0,5 segundos, mientras que otros modos de realización pueden
50 incluir tiempos de apertura de duración más corta o mayor. El procesador 122 puede controlar una energía del láser y duración del pulso a través de la comunicación con el láser 136.

El procesador 122 utiliza la interfaz 130 de comunicación para comunicarse con el sistema 21 de adquisición de datos. La interfaz 130 de comunicación puede incluir un único método o combinación de métodos para transferir
55 datos. Algunos métodos pueden incluir un puerto de bus universal de serie (USB) o un puerto IEEE 1394 para conectividad por cable con altas velocidades de transferencia de datos. En algunos modos de realización, un dispositivo de almacenamiento se puede conectar directamente a uno de estos puertos para almacenamiento de datos para procesamiento posterior. Los datos pueden ser procesados previamente por el procesador 122 y quedar listos para su visualización, o puede ser necesario procesar los datos brutos completamente antes de que
60 pueda comenzar el análisis.

Las comunicaciones con el dispositivo 10 de detección también se pueden realizar por comunicación de radiofrecuencia (RF) o una conexión de red de área local (LAN). Además, la conectividad puede lograrse por
65 conexión directa o a través de un punto de acceso a la red, como un concentrador o enrutador, que puede admitir comunicaciones por cable o inalámbricas. Por ejemplo, el dispositivo 10 de detección puede transmitir datos en una determinada frecuencia de RF para su recepción por el dispositivo 21 de adquisición de datos

objetivo. El dispositivo 21 de adquisición de datos puede ser, por ejemplo, un ordenador de propósito general, un ordenador portátil, un dispositivo informático portátil o un dispositivo específico para aplicaciones. Además, múltiples dispositivos de adquisición de datos pueden recibir los datos simultáneamente. En otros modos de realización, el dispositivo 21 de adquisición de datos puede incluirse con el dispositivo 10 de detección como un sistema integrado de detección y adquisición.

Además, el dispositivo de detección 10 puede descargar datos actualizados de software, firmware y calibración desde un dispositivo remoto a través de una red, tal como Internet. La interfaz 130 de comunicación también puede permitir que el procesador 122 supervise el informe de inventario de cualquier fallo. Si se producen problemas de funcionamiento, el procesador 122 puede ser capaz de enviar información de errores para ayudar al usuario a solucionar los problemas proporcionando datos de funcionamiento. Por ejemplo, el procesador 122 puede proporcionar información para ayudar al usuario a diagnosticar un elemento de calentamiento defectuoso o un problema de sincronización.

La fuente 132 de energía entrega potencia operativa a los componentes del dispositivo 10. La fuente 132 de energía puede utilizar electricidad desde una toma de corriente convencional de 115 voltios o incluir una batería y un circuito de generación de energía para producir la potencia operativa. En algunos modos de realización, la batería puede ser recargable para permitir un funcionamiento prolongado. Por ejemplo, el dispositivo 10 puede ser portátil para la detección de muestras biológicas en una emergencia, tal como una zona de desastre. La recarga puede realizarse a través de la toma de corriente de 115 voltios. En otros modos de realización, se pueden usar baterías tradicionales.

La figura 9 es un diagrama de bloques funcional del único detector 18 acoplado a cuatro fibras ópticas del haz de fibras ópticas. En este modo de realización, el detector 18 es un tubo fotomultiplicador. Cada pata del haz 14 de fibra óptica, fibra 14A óptica, fibra 14B óptica, fibra 14C óptica y fibra 14D óptica, se acopla a una interfaz 138 de entrada óptica del detector 18. De esta manera, la luz transportada por cualquiera de las fibras 14 ópticas se proporciona a una única interfaz 138 de entrada óptica del detector 18. La interfaz 138 de entrada óptica proporciona la luz en su conjunto a un multiplicador 140 de electrones. El ánodo 142 recoge los electrones y produce una señal analógica correspondiente como señal de salida.

En otras palabras, como se muestra, las fibras 14 ópticas encajan dentro de la apertura óptica de entrada para el detector 18. Por consiguiente, el detector 18 se puede usar para detectar luz de cada pata del haz 14 óptico simultáneamente. La interfaz 138 de entrada óptica proporciona la luz al multiplicador 140 de electrones. Para un tubo fotomultiplicador, los fotones de las fibras ópticas golpean primero un cátodo fotoemisor, que a su vez libera fotoelectrones. Los fotoelectrones se organizan en cascada golpeando una serie de dínodos, emitiéndose más fotoelectrones al entrar contacto con cada dínodo. El grupo de electrones resultante ha multiplicado esencialmente las pequeñas señales de luz originalmente transmitidas por las fibras 14 ópticas. El mayor número de electrones finalmente se recoge por el ánodo 142. Esta corriente del ánodo 142 se transfiere mediante una corriente al amplificador 144 de tensión como una señal de salida analógica que es representativa de las señales fluorescentes ópticas de la muestra proporcionadas por la pluralidad de módulos 16 ópticos.

La unidad 23 de control incluye un convertidor 146 analógico a digital (A/D) que convierte la señal analógica en una corriente de datos digitales muestreados, es decir, una señal digital. El procesador 122 recibe la señal digital y almacena los datos muestreados en la memoria 124 para su comunicación al dispositivo 21 de adquisición de datos, como se describió anteriormente. En algunos modos de realización, el convertidor 146 A/D puede estar contenido dentro del detector 18 en lugar de la unidad 23 de control.

De esta manera, se puede utilizar un único detector 18 para recoger toda la luz del haz 14 óptico y producir una señal representativa del mismo. Una vez que la señal es amplificada por el amplificador 144 y convertida en una señal digital, puede separarse digitalmente en datos correspondientes a la luz recogida por cada módulo 16 óptico individual. La señal completa (es decir, agregada) puede separarse por intervalo de frecuencia en cada señal detectada representativa de cada fluorescencia. Estas frecuencias pueden estar separadas por un filtro digital aplicado por el dispositivo 21 de adquisición de datos o dentro del dispositivo 10.

En otros modos de realización, la señal amplificada puede separarse por frecuencia usando filtros analógicos y enviarse a canales separados antes del convertidor 146 A/D. Cada canal puede digitalizarse por separado y enviarse al dispositivo de adquisición de datos. En cualquier caso, el detector individual es capaz de capturar toda la información de fluorescencia de cada módulo 16 óptico. El dispositivo 21 de adquisición de datos puede representar y analizar la señal adquirida desde cada cámara del disco 13 en tiempo real sin la necesidad de múltiples detectores.

En algunos modos de realización, el detector 18 puede no ser un tubo fotomultiplicador. En general, el detector 18 puede ser cualquier tipo de dispositivo de detección analógico o digital capaz de capturar luz de múltiples patas de un mecanismo de suministro óptico, es decir, haz 14 de fibras, y producir una representación transmisible de la luz capturada.

La figura 10 es un diagrama de bloques funcional que ilustra detalles adicionales de un dispositivo 21 de adquisición de datos ejemplar, que puede ser un dispositivo informático general, tal como un ordenador de sobremesa, que ejecuta software en uno o más microprocesadores. En el modo de realización ilustrado, el dispositivo 21 de adquisición de datos se puede ver funcionalmente como incluyendo un módulo 135 de control, un módulo 137 de interfaz, un módulo 139 de base de datos, un módulo 141 de comunicación y un módulo 143 de análisis.

El módulo de interfaz 137 representa el software y el hardware necesarios para interactuar con un usuario, por ejemplo, para recibir datos de un usuario 149 y para enviar información al usuario 149. El módulo 137 de interfaz puede recibir datos de dispositivos 147 de entrada y enviar datos a dispositivos 145 de salida que permiten a un usuario interactuar con el sistema 10. Por ejemplo, el usuario 149 puede cambiar los parámetros operativos del dispositivo 12 de detección y el dispositivo 21 de adquisición de datos y manipular los datos almacenados en el módulo 139 de base de datos. Además, el usuario 149 puede interactuar con el módulo 137 de interfaz para iniciar la amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real de las muestras 17 almacenadas dentro de las cámaras del disco 13. Además, el usuario 149 puede interactuar con el dispositivo 21 de adquisición de datos para ver y manipular los datos adquiridos. Durante este proceso, el módulo 137 de interfaz puede presentar a un usuario pantallas de interfaz de usuario para interactuar con el dispositivo 21 de adquisición de datos, incluyendo, por ejemplo, las pantallas de interfaz de usuario ejemplares mostradas en las figuras 18-20, 23. Los dispositivos 147 de entrada ejemplares incluyen un teclado, una pantalla táctil, un ratón, un micrófono y similares. Los dispositivos 145 de salida pueden incluir, por ejemplo, una pantalla LCD, una matriz LED, una pantalla CRT o una pantalla táctil.

El módulo 135 de control representa una lógica de control que, en respuesta a datos recibidos del usuario 149 a través del módulo 137 de interfaz, dirige el funcionamiento del dispositivo 12 de detección de fluorescencia. Por ejemplo, el módulo 135 de control puede comprender instrucciones de software que, cuando se ejecutan, proporcionan lógica de control para comunicar órdenes a la unidad 23 de control del dispositivo 12 de detección de fluorescencia para comenzar la amplificación de ácidos nucleicos y la recogida de datos. Además, el módulo 135 de control puede proporcionar órdenes para solicitar y recibir datos de amplificación almacenados temporalmente en la unidad 23 de control durante o después de la finalización de cada período de interrogación. Además, el módulo 135 de control proporciona lógica de control para almacenar los datos de amplificación almacenados temporalmente en el módulo 139 de base de datos, y para invocar al módulo 143 de análisis para procesar los datos en respuesta a las órdenes del usuario 149.

El módulo 143 de análisis recibe datos de amplificación del módulo 135 de control, procesa los datos de amplificación usando valores de corrección de la interferencia espectral, y proporciona los datos procesados al módulo 137 de interfaz para su visualización. Por ejemplo, el módulo 143 de análisis puede calcular una señal corregida para un canal particular sustrayendo de una señal corregida por el fondo el producto de un factor de corrección para el canal y una señal del vecino espectral. Como otro ejemplo, el módulo 143 de análisis puede calcular una señal corregida para un canal particular sustrayendo de una señal corregida por el fondo el producto de un factor de corrección para el canal y una señal del vecino espectral más cercano.

El módulo 137 de interfaz puede mostrar a continuación los datos corregidos en una pantalla de dispositivos 145 de salida. El módulo 137 de interfaz puede mostrar el valor de datos corregidos como texto, como puntos de datos en un gráfico, como parte de una tabla, o similar. En otros modos de realización, el módulo 137 de interfaz puede mostrar un mensaje basado en los datos en una pantalla del dispositivo 36 de salida. Por ejemplo, el módulo 143 de análisis puede interpretar los datos simplemente para indicar que está presente cierto ácido nucleico en la muestra que se ha sometido a amplificación de ácidos nucleicos. El módulo 137 de interfaz puede mostrar a continuación un mensaje que indica la presencia de este segmento de ácido nucleico en la muestra. Por el contrario, si no se detecta crecimiento en un canal particular para la muestra (es decir, no se ha producido amplificación), el módulo 143 de análisis puede interpretar esto para indicar que no hay ácido nucleico con cierta secuencia presente en la muestra, y el módulo 137 de interfaz puede mostrar un mensaje correspondiente.

En algunos modos de realización, el módulo 143 de análisis o el módulo 135 de control puede aplicar técnicas de preparación de datos, tales como suavizado de curvas, reducción de ruido, o similares antes de analizar los datos de amplificación usando compensación de la interferencia.

El dispositivo 21 de adquisición de datos puede ser una estación de trabajo de propósito general, un ordenador de sobremesa, un ordenador portátil, un dispositivo informático portátil, un asistente digital personal (PDA) u otro dispositivo informático. El dispositivo 21 de adquisición de datos puede incluir un microprocesador, un procesador de señal digital (DSP), una matriz de puertas programables (FPGA), un circuito integrado de aplicación específica (ASIC) u otro hardware, firmware y/o software para implementar las técnicas. En otras palabras, el análisis de los datos de amplificación por PCR, tal como se describe en el presente documento, puede implementarse en hardware, software, firmware, combinaciones de los mismos o similares. Si se implementa en software, un soporte legible por ordenador puede almacenar instrucciones, es decir, código de programa, que puede ejecutar un procesador o DSP para llevar a cabo una o más de las técnicas descritas anteriormente. Por ejemplo, el soporte legible por ordenador puede comprender soportes magnéticos, soportes

ópticos, memoria de acceso aleatorio (RAM), memoria de solo lectura (ROM), memoria de acceso aleatorio no volátil (NVRAM), memoria de solo lectura programable y borrable eléctricamente (EEPROM), memoria flash u otro soporte adecuado para almacenar el código del programa.

5 La figura 11 es un diagrama de flujo que ilustra el funcionamiento del dispositivo 10 de detección de fluorescencia multiplex. Inicialmente, un usuario especifica los parámetros del programa en el dispositivo 21 de adquisición de datos o a través de una interfaz con la unidad 23 de control (148). Por ejemplo, estos parámetros pueden incluir velocidades de rotación y períodos de tiempo para hacer girar el disco 13, definir perfiles de temperatura para cada período de interrogación, tipos de muestra y ubicaciones de las muestras en el disco 13, tipos de marcadores fluorescentes, longitudes de onda del detector y similares. En algunos modos de realización, estos parámetros también pueden incluir los valores de corrección de la interferencia. En otros modos de realización, el dispositivo 21 de adquisición de datos puede configurarse con los valores de corrección de la interferencia durante la fabricación.

15 A continuación, el usuario carga el disco 13 en el dispositivo 10 de detección (150). Tras fijar el dispositivo 10, el usuario inicia el programa (152), haciendo que la unidad de control 23 controle la plataforma 25 para comenzar a hacer girar el disco (154) a la velocidad especificada. Después de que el disco haya comenzado a girar, pueden ocurrir dos procesos simultáneos.

20 En primer lugar, el dispositivo 10 de detección comienza a detectar fluorescencia desde la luz de excitación (156) producida por una o más reacciones dentro de una o más muestras. El detector 18 amplifica las señales de fluorescencia de cada muestra, que se sincronizan con cada muestra respectiva y el tiempo en el que se emitió la fluorescencia (158). Durante este proceso, el procesador 122 guarda los datos capturados en la memoria 124 y puede comunicar los datos al dispositivo 21 de adquisición de datos en tiempo real para supervisar el progreso del experimento y para un procesamiento adicional que incluye la aplicación de valores de corrección de la interferencia espectral (160). De forma alternativa, el procesador 122 puede guardar los datos dentro del dispositivo 10 hasta que se complete el programa. El procesador 122 continúa detectando la fluorescencia de las muestras y guarda los datos hasta que se completa el programa (162). Una vez que se completa el experimento, la unidad 23 de control detiene la rotación del disco (164). En algunos modos de realización, el procesador 122 puede aplicar él mismo los valores de corrección de la interferencia espectral como se describe en el presente documento, en lugar del dispositivo 21 de adquisición de datos.

35 Durante este proceso, la unidad 23 de control supervisa la temperatura del disco (166) y modula la temperatura del disco, o cada muestra, para alcanzar la temperatura objetivo para ese momento (168). La unidad 23 de control continúa supervisando y controlando las temperaturas hasta que el programa se completa (170). Una vez que se completa el experimento, la unidad 23 de control mantiene la temperatura de las muestras a una temperatura de almacenamiento objetivo, normalmente 4 grados Celsius (172).

40 El funcionamiento del dispositivo 10 puede variar con respecto al ejemplo de la figura 11. Por ejemplo, las revoluciones por minuto del disco pueden modificarse en todo el programa, y el láser 136 se puede utilizar para abrir válvulas entre cámaras en el disco para permitir múltiples reacciones. Estas etapas pueden ocurrir en cualquier orden dentro del funcionamiento, según el programa que el usuario defina.

45 La figura 12 es un diagrama de flujo que ilustra un método ejemplar si se detecta luz y se muestrean datos del disco. Inicialmente, un usuario especifica qué módulos detectarán fluorescencia del disco 13, y la unidad 23 de control enciende el LED de un módulo (149). Una vez que el LED se ha calentado a estado de equilibrio, la unidad 23 de control hace girar el disco 13 una rotación a la velocidad de aproximadamente 1470 revoluciones por minuto (151). Durante esa rotación, el módulo recoge luz fluorescente de las cámaras de proceso del disco 13 (153), y la unidad 23 de control coloca 16 muestras de cada cámara de proceso en el BIN de memoria asociado a cada cámara de proceso (155).

50 Si el disco 13 debe girar otra rotación (157), la unidad 23 de control ejecuta otra revolución del disco 13 (151). Si se han muestreado 16 revoluciones, el módulo ha completado la detección con el LED. Por lo tanto, cada cámara de proceso se muestreó un total de 256 veces y el dispositivo 21 de adquisición de datos integra las muestras para crear un histograma de cada cámara de proceso. La unidad 23 de control apaga el LED (159). Si se debe utilizar otro módulo para continuar la detección (161), la unidad 23 de control enciende el LED del siguiente módulo (149). Si no se necesitan otros módulos para recoger datos, la unidad 23 de control interrumpe la recogida de datos del disco 13.

60 En algunos modos de realización, cada cámara de proceso puede muestrearse más o menos veces. La unidad 23 de control puede hacer girar el disco 13 a mayor velocidad para proporcionar resultados más rápidos o hacer girar el disco 13 más lentamente para adquirir más muestras. En otros modos de realización, los LED de dos o más módulos se pueden encender para detectar fluorescencia simultáneamente en múltiples longitudes de onda.

65 Las figuras 13 y 14 muestran los espectros de absorción y emisión, respectivamente, de colorantes fluorescentes utilizados frecuentemente que pueden utilizarse con el dispositivo 10 para la PCR multiplex. En estos ejemplos,

la figura 13 muestra que los máximos de absorción de los colorantes varían de 480-620 nm, y la figura 14 muestra que los máximos de emisión resultantes varían de 520-670 nm. Las señales de los espectros de absorción para cada colorante en la figura 13 están numerados como FAM 174, JOE 178, Tx Red 186 y Cy5 188. Las señales de los espectros de emisión en la figura 14 son FAM 190 JOE 196, Tx Red 202 y Cy5 204. Los filtros y colorantes mostrados en el presente documento se usan a modo de ejemplo. Otros ejemplos de colorantes que pueden usarse de forma adicional o alternativa incluyen Sybr, TET, HEX, ROX, VIC, Tamra y Cy3. FAM, HEX, JOE, VIC, TET, ROX son marcas comerciales de Applera, Norwalk, California. Tamra es una marca comercial de AnaSpec, San Jose, California. Texas Red es una marca comercial de Molecular Probes. Cy3 y Cy5 son marcas comerciales de Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido.

Los colorantes fluorescentes están espectralmente espaciados de forma próxima entre sí, y se diferencian mediante el uso de filtros ópticos para minimizar la transferencia de señal de un colorante a otro. Debido a las amplias bandas de absorción y emisión de los fluoróforos típicos, los filtros pueden reducir, pero no eliminar, la interferencia espectral. La interferencia espectral de una señal fuertemente amplificadora a menudo dará como resultado un crecimiento en un canal vecino y puede interpretarse como un crecimiento en un canal objetivo. Las técnicas descritas en el presente documento usan un conjunto de factores de corrección determinados a partir de un procedimiento de calibración para eliminar automáticamente las señales interferentes.

La tabla 1 enumera componentes ejemplares que pueden usarse en un dispositivo 10 de detección de fluorescencia multiplex de cuatro canales (figura 1) para una variedad de colorantes fluorescentes. La tabla 1 resume la elección de filtros utilizados en los diferentes módulos ópticos. Los anchos de banda de los filtros de excitación y emisión se muestran a continuación.

TABLA 1

Canal / Número de módulo óptico	LED	Nombre de filtro	Filtro de excitación	Filtro de detección/emisión	Colorantes compatibles
1	Azul	"FAM"	475 ± 20 nm	520 ± 10 nm	FAM, Sybr Green
2	Verde	"JOE"	520 ± 10 nm	560 ± 10 nm	HEX, JOE, VIC, TET
3	Naranja	"TxRed"	580 ± 10 nm	610 ± 10 nm	TAMRA, ROX, Texas Red, Cy3
4	Rojo	"Cy5"	635 ± 10 nm	680 ± 20 nm	Cy5

Los filtros se eligieron para tener un ancho de banda pequeño (nominalmente 10 nm a la mitad del ancho máximo del pico) para maximizar la señal de cada colorante, sin detectar colorantes vecinos. Los colorantes, sin embargo, tienen bandas bastante anchas, que pueden dar lugar a interferencia de los colorantes vecinos. Por ejemplo, para la detección de la sonda marcada FAM, la excitación se centra a 475 nm, que está cerca del 50 % de intensidad de absorción normalizada, pero también tiene una intensidad de absorción normalizada del 10-20 % para las sondas HEX, HOE y TET. La detección de la sonda FAM se centra en 520 nm (intensidad de emisión normalizada del 100%), que también cubre una intensidad de emisión normalizada del 10-20 % de las sondas HEX, Joe y TET. También es evidente según los espectros de absorción y emisión que se muestran en las figuras 13 y 14 que habría muy poca interferencia de la sonda FAM en los canales Texas Red ("TxRed") y Cy5 porque los filtros del módulo FAM no se superponen a los espectros de esos colorantes.

Para los otros módulos, se aplica la misma lógica. Puede haber interferencia significativa de los colorantes objetivo de interés en los módulos vecinos. A la interferencia en el canal Texas Red contribuye la banda de absorción superpuesta del colorante Cy5, y la interferencia en el canal Cy5 se debe a la superposición de las bandas de absorción y emisión de Texas Red.

Los datos mostrados en los gráficos de absorción y emisión de las figuras 13-14 se obtienen a partir del análisis de colorantes puros solamente. Una vez que se producen sondas marcadas con colorante, habrá cambios significativos en los espectros debido a los cambios en la densidad electrónica que rodea al fluoróforo por la estructura del oligonucleótido de la sonda. Los cambios, en general, modifican las bandas de absorción y emisión a longitudes de onda más largas, pero suceden en diversas cantidades debido a la secuencia específica de nucleótidos para la sonda de interés. Por lo tanto, puede ser importante calibrar la compensación espectral con datos de amplificación, tales como datos de PCR en tiempo real, con las sondas apropiadas en una serie de reacciones singleplex. Se pueden explorar todos los canales para cada reacción, aunque solo haya una diana presente, para cuantificar la cantidad de interferencia de esa sonda en los módulos vecinos. El procedimiento de calibración calcula un factor de corrección de la interferencia, que se aplica a datos multiplex para eliminar la interferencia.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 En un ejemplo, se llenó un disco de 96 cámaras con diferentes concentraciones de colorante FAM y ROX diluido en tampón de reacción para PCR estándar. Se añadieron cuatro réplicas de cada colorante en una serie de diluciones 2x, comenzando a partir de FAM 200 nM y ROX 2000 nM. Cada volumen de muestra fue de 10 l. La cámara 82 tenía una mezcla de 5 µl de FAM 200 nM y 5 µl de ROX 2000 nM. El dispositivo 10 se construyó como un dispositivo de detección de PCR multiplex de dos canales que tenía dos módulos 16 ópticos para la detección de los colorantes.

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

20 Se realizó una amplificación por PCR, y las señales fluorescentes de las muestras se multiplexaron en un haz de fibra óptica bifurcado. El haz de fibra se conectó con un único detector, específicamente un tubo fotomultiplicador (PMT). Los datos fueron recogidos por una placa de adquisición de datos (DAQ) de National Instruments interconectada con un programa de adquisición de datos de Visual Basic que se ejecuta en un ordenador de propósito general. Los datos se adquirieron mientras el disco giraba a 1000 revoluciones por minuto (nominalmente). El módulo FAM y el módulo ROX se usaron secuencialmente para interrogar las muestras. Cada exploración consistió en un promedio de 50 rotaciones. Los datos brutos de los dos módulos ópticos se muestran en las figuras 15A y 15B.

25 El gráfico en la figura 15A se adquirió alimentando el LED en el módulo FAM, y el gráfico en la figura 15B se adquirió alimentando el LED en el módulo ROX.

30 Durante la amplificación, los datos recopilados mostraron claramente que había un desfase temporal asociado a módulos ópticos que se situaban físicamente sobre cámaras diferentes en un momento dado. Se calculó un valor de compensación determinando el desfase temporal entre los módulos ópticos 1 y 2 para una cámara particular, es decir, la cámara 82 en este caso. En otras palabras, el desfase temporal indica la cantidad de tiempo de retraso entre los datos capturados por el módulo FAM y los datos capturados por el módulo ROX para la misma cámara.

35 La figura 16 es un gráfico que muestra los datos integrados con sustracción del desfase para cada cámara. FAM se indica mediante barras de líneas punteadas, ROX se indica con barras de líneas continuas y los datos de ROX se colocan sobre los datos FAM. Los datos mostraron que no había señal del colorante ROX en el módulo óptico 1 ni señal del colorante FAM en el módulo óptico 2. Había un fondo más alto en el módulo óptico 1, que puede rectificarse usando un conjunto optimizado de filtros. Los datos se analizaron para determinar el límite de detección (LOD), descrito como la señal equivalente al nivel de ruido basal. El nivel de ruido basal se definió como el promedio de diez exploraciones de una cámara en blanco más 3 veces la desviación estándar.

45 El LOD se determinó mediante un ajuste de mínimos cuadrados lineales de la señal integrada representada gráficamente frente a la concentración de los patrones de FAM y ROX. Se calculó que el LOD de los módulos FAM y ROX era 1 y 4 nM, respectivamente, como se muestra en las figuras 17A y 16B.

50 La figura 18 es una captura de pantalla ejemplar de una interfaz de usuario de control de temperatura. La pantalla 250 de control de temperatura está resaltada y muestra los controles 252 de temperatura. El gráfico 254 de temperatura emite lecturas de temperatura mientras que el indicador 256 de estado muestra información general. La ventana 258 de mensajes muestra órdenes cuando se ejecuta el dispositivo 10 de detección.

55 El técnico puede seleccionar la pantalla 250 de control de temperatura para ver la información de temperatura del dispositivo 10. La pantalla 250 de control de temperatura es una de varias pantallas que pueden seleccionarse para visualizar información asociada con el funcionamiento de la unidad d23 e control o el dispositivo 21 de adquisición de datos. La pantalla 250 incluye controles 252 de temperatura que muestran información numérica al técnico. El gráfico 254 de temperatura muestra información gráfica de la temperatura como un gráfico de la temperatura en función del tiempo. En algunos modos de realización, el técnico puede cambiar manualmente los valores situados dentro de los controles 252 de temperatura.

60 El indicador 256 de estado siempre está visible para el técnico. El indicador 256 de estado muestra los tiempos de funcionamiento relevantes, el número de ciclo, la temperatura y otra información importante. La ventana 258 de mensajes muestra las órdenes actuales para controlar la unidad 23. La ventana 258 incluye una barra de desplazamiento para localizar cualquier orden entregada a la unidad 23 de control durante el funcionamiento del dispositivo 10. En algunos modos de realización, la ventana 258 de mensajes puede mostrar información de errores u otra información importante al técnico.

65

La figura 19 es una captura de pantalla ejemplar de una interfaz de usuario de control óptico. La pantalla 260 de control óptico está resaltada y muestra el gráfico 262 de señales. El histograma 264 muestra la señal integrada de cada cámara de proceso. La pantalla 260 también incluye la ventana 266 de mensajes y el control 268 de desplazamiento.

El gráfico 262 de señales muestra los datos ópticos brutos detectados por el dispositivo 10 de detección. La señal mostrada en el gráfico 262 es la señal en bruto de los módulos ópticos 48, 52 y 56 e incluye períodos de interrogación que corresponden al cambio de señal entre las cámaras de proceso. El técnico puede cambiar el control 268 de desviación para que coincida con el agrupamiento de la señal en cajones apropiados que representan cada cámara de proceso con la forma de onda de la señal. La pérdida de señal entre cada pico representa la detección de luz del disco 13 entre cada cámara de proceso. La señal correspondiente se integra para producir el histograma 264 que presenta la señal detectada de cada una de las 96 cámaras de proceso. La unidad 23 de control integra 16 muestras de una cámara de proceso en cada una de las 16 rotaciones del disco 13. El histograma 264, por lo tanto, contiene 256 muestras de los contenidos en cada cámara de proceso de muestras. En algunos modos de realización, el software puede ajustar automáticamente el control 268 de desplazamiento reconociendo elementos de la forma de onda de la señal bruta. La ventana 266 de mensajes muestra información de órdenes y mensajes de error relacionados con el control óptico y la detección de luz.

La figura 20 es una captura de pantalla ejemplar de una interfaz de usuario. La pantalla 270 de datos está resaltada y muestra el histograma 272 y el gráfico 274 del producto. La pantalla 270 muestra los datos en tiempo real que se están recogiendo de las cámaras de proceso del disco 13. El histograma 272 muestra la señal integrada para cada cámara de proceso mientras que el gráfico 274 del producto muestra la cantidad de producto amplificado como una función del número de período de interrogación. En otros modos de realización, los resultados para las cámaras de proceso pueden variar con diferentes aplicaciones.

La figura 21 es un gráfico que ilustra una curva de amplificación por PCR para una muestra de ácido nucleico de ejemplo. El dispositivo 21 de adquisición de datos también puede convertir los datos del detector 18 para una pluralidad de ciclos de PCR en una única sesión de amplificación por PCR en una curva de amplificación, tal como la curva 280 de amplificación que se muestra en la figura 21. Para una sesión de amplificación por PCR típica, la curva 280 de amplificación representa la amplificación de una muestra detectada por fluorescencia para cada uno de una pluralidad de ciclos de PCR. La curva 280 de amplificación puede incluir un único valor de intensidad de fluorescencia para cada uno de la pluralidad de ciclos de PCR, con una curva ajustada a los datos. La curva puede ajustarse usando, por ejemplo, regresión lineal, o simplemente puede conectar datos de fluorescencia de períodos de interrogación adyacentes con una línea suavizada o no suavizada. En otros modos de realización, la curva 280 de amplificación puede incluir más de un valor de intensidad de fluorescencia para cada uno de la pluralidad de ciclos de PCR. La curva de amplificación para una única sesión de amplificación por PCR puede dividirse, en general, en aproximadamente tres regiones: el período 282 basal, el período 284 de crecimiento y el período 286 de meseta.

En algunos modos de realización, el dispositivo 21 de adquisición de datos puede aplicar transformación de ondículas a los datos de amplificación o curva 280 de amplificación para determinar un punto a lo largo de la curva de amplificación, denominado ciclo umbral (expresado como Ct) o un valor de $T_{m\acute{a}x}$, que es un ciclo de PCR que corresponde a un punto dentro del período 284 de crecimiento de los datos de amplificación o la curva 280 de amplificación. En un modo de realización de ejemplo, la transformación de ondículas de los datos de amplificación o la curva 280 de amplificación produce una representación de la frecuencia del período de interrogación de la curva 280 de amplificación, que en general ha complicado la dependencia del período de interrogación. Después de realizar la transformación de ondículas, el dispositivo 21 de adquisición de datos identifica un valor de $T_{m\acute{a}x}$ como un valor del período de interrogación dentro de los datos de amplificación transformados en los que uno o más componentes de frecuencia de los datos de amplificación transformados tienen la mayor magnitud. Es decir, el dispositivo 21 de adquisición de datos aplica la transformación de ondículas a los datos de amplificación para descomponer los datos de amplificación en una serie de funciones básicas (es decir, ondículas). Esto permite que se analicen los datos de amplificación para identificar los componentes de frecuencia de magnitud mayor mientras se mantiene la relación del período de interrogación de los componentes. Como resultado, el dispositivo 21 de adquisición de datos puede identificar un período de interrogación que tiene la magnitud de ondículas local mayor para uno o más segmentos de frecuencia dentro de los datos de amplificación transformados y correlacionar esto con un valor de $T_{m\acute{a}x}$ para la sesión de amplificación por PCR asociada a los datos de amplificación. El dispositivo 21 de adquisición de datos puede entonces actualizar una pantalla basada en el valor de $T_{m\acute{a}x}$.

La figura 22 es un gráfico que ilustra una curva estándar para una serie de dilución de ácido nucleico de ejemplo. Cuando el sistema 9 realiza la PCR en una pluralidad de muestras que incluyen diferentes concentraciones iniciales conocidas de un ácido nucleico, el dispositivo 21 de adquisición de datos puede generar un gráfico 290 que incluye una curva 292 estándar del $T_{m\acute{a}x}$ de la muestra frente a un logaritmo de la concentración inicial de ADN (DNA0), como se muestra en la figura 22. La curva 292 estándar puede incluir un ajuste de línea a una pluralidad de puntos de datos ($\ln(\text{ADN0})$, $T_{m\acute{a}x}$) usando regresión lineal u otra técnica de ajuste de curvas. El

dispositivo 21 de adquisición de datos puede usar posteriormente la curva 292 estándar o una ecuación representativa de la curva 292 estándar para cuantificar una concentración inicial de una muestra de ácido nucleico que tiene una concentración inicial desconocida de ácido nucleico. Por ejemplo, el dispositivo 21 de adquisición de datos puede determinar un valor de $T_{m\acute{a}x}$ para la muestra que tiene una concentración inicial desconocida de ácido nucleico. El dispositivo 21 de adquisición de datos puede entonces representar gráficamente el valor de $T_{m\acute{a}x}$ a lo largo de la curva 292 estándar en un punto correspondiente al valor de $T_{m\acute{a}x}$, o puede insertar el valor de $T_{m\acute{a}x}$ en la ecuación de la curva 292 estándar para determinar la concentración inicial de ácido nucleico en la muestra. El dispositivo 21 de adquisición de datos también puede usar la curva 292 estándar para determinar una eficiencia de la reacción de PCR. Se pueden encontrar detalles adicionales relacionados con la aplicación de transformación de ondículas a datos de amplificación en la publicación de la solicitud de patente PCT n.º WO 2009/132,268, titulada "ANALYSIS OF NUCLEIC ACID AMPLIFICATION CURVES USING WAVELET TRANSFORMATION" (Análisis de curvas de amplificación de ácidos nucleicos utilizando transformación de ondículas).

La figura 23 muestra una pantalla de interfaz de usuario ejemplar que el módulo 337 de interfaz puede presentar a un usuario. La figura 23 ilustra una pantalla 320 que incluye una ventana 322 para introducir los parámetros para la reacción de PCR. La ventana 322 incluye una pestaña 324 "Información general", una pestaña 326 "Añadir muestras" y una pestaña 328 "Definir ciclos" que están vinculadas a paneles de vista separados dentro de la ventana 322. La pestaña 324 "Descripción general" se selecciona en la pantalla 320. El panel 342 de vista vinculado a la pestaña 324 "Descripción general" incluye un cuadro 332 de texto, que acepta la entrada textual de notas sobre la reacción de PCR que se ejecutará, una lista 330 desplegable que permite a un usuario introducir el tipo de disco 13 que se usa, y un cuadro 344 de texto, que permite al usuario introducir un nombre de la prueba. El panel 342 de vista también puede incluir una pantalla 346 gráfica del disco 13 seleccionado usando una lista 330 desplegable. Mientras que la figura 23 ilustra el tipo de disco 13 que se selecciona usando una lista 330 desplegable, en otros modos de realización, el tipo de disco 13 puede seleccionarse mediante otro elemento de la interfaz de usuario, tal como, por ejemplo, un botón de radio, un icono, un cuadro de texto, una casilla de verificación o similar.

La pantalla 320 también incluye una pluralidad de miniaplicaciones de navegación 334, 336, 338 y 340, que incluye cada uno una serie de hipervínculos. La miniaplicación 334 de tareas incluye hipervínculos que dirigen a un usuario a pantallas para realizar tareas frecuentes, como definir un experimento nuevo, ejecutar un experimento, analizar datos o crear un informe. La miniaplicación 336 de edición incluye hipervínculos que dirigen a un usuario a una pantalla de edición que permite editar un conjunto de parámetros de reacción de PCR recientemente definidos. La miniaplicación 338 incluye hipervínculos que dirigen a un usuario a una pantalla que permite a un usuario ejecutar el disco 13 actualmente cargado con un conjunto de parámetros de reacción de PCR recientemente definidos. La miniaplicación 340 incluye hipervínculos que dirigen a un usuario a una pantalla que permite a un usuario analizar datos de amplificación por PCR recogidos y guardados recientemente.

La figura 24 es un diagrama de flujo que ilustra el funcionamiento de ejemplo del dispositivo 21 de adquisición de datos (figura 1) en la determinación de valores de corrección de la interferencia espectral para calibrar el dispositivo 10 de detección de fluorescencia multiplex. Aunque se describe con fines de ejemplo con respecto al dispositivo 21 de adquisición de datos, el proceso de determinación de los valores de corrección de la interferencia espectral puede realizarse por otros dispositivos, como la unidad 23 de control del dispositivo 10 de detección de fluorescencia multiplex, o por otro dispositivo (no mostrado) separado del sistema 9. Además, aunque se describe a efectos de ejemplo con respecto a la amplificación por PCR, las técnicas mostradas en la figura 25 son fácilmente aplicables a otras técnicas para la amplificación de ácidos nucleicos, tales como la amplificación mediada por transcripción (TMA).

Se realiza una reacción de PCR en tiempo real singleplex con una muestra de ácido nucleico para cada sonda (por ejemplo, colorante) y el correspondiente módulo 16 de interés (350). Como se describió anteriormente, en algunos modos de realización, los valores de corrección de la interferencia se determinan a partir de señales de reacciones de PCR realizadas con muestras de ácido nucleico reales. En cada una de las reacciones singleplex, la sonda de interés se denomina sonda diana. El término «singleplex» se refiere al hecho de que la sonda diana es la única sonda que se usa en la reacción. Para calibrar el dispositivo 10 de la figura 1, por ejemplo, se llevan a cabo cuatro reacciones de PCR en tiempo real singleplex separadas, una para cada sonda diana correspondiente a cada uno de los cuatro módulos 16 del dispositivo 10. Para cada reacción de PCR, se obtiene una señal que comprende datos de PCR en cada canal, es decir, mediante cada uno de los módulos 16 (352). El dispositivo 21 de adquisición de datos realiza una sustracción basal para cada canal para filtrar el ruido de fondo, lo que da como resultado una señal con sustracción del fondo (354). Esto se denota por la ecuación 1:

$$\text{señal}_{bk} = \text{señal}_i - bk_i \quad (1)$$

en la que el índice i corresponde a un módulo con un colorante objetivo, el índice j corresponde a un módulo con un colorante que es el vecino espectral más cercano al colorante objetivo, y bk_i denota una cantidad atribuible al ruido de fondo.

El dispositivo 21 de adquisición de datos determina los valores de corrección Cor_i para cada canal (356). Los valores de corrección de la interferencia se pueden determinar para cada uno de una pluralidad de períodos de interrogación. Los valores de corrección de la interferencia pueden ser factores de corrección basados en el(los) vecino(s) espectral(es) más cercano(s). Por ejemplo, los factores de corrección para los módulos FAM, JOE, TxRed y Cy5 se muestran a continuación:

$$COR_{FAM} = \frac{señal_{bk,JOE}}{señal_{bk,FA}} \quad (2)$$

$$COR_{JOE} = \frac{señal_{bk,FAM}}{señal_{bk,JOE}} \quad (3)$$

$$COR_{TxRed} = \frac{señal_{bk,Cy5}}{señal_{bk,TxRed}} \quad (4)$$

$$COR_{Cy5} = \frac{señal_{bk,TxRed}}{señal_{bk,Cy5}} \quad (5)$$

10 Como se ilustra en las ecuaciones 2-5 anteriores, el vecino espectral más cercano para el módulo FAM es JOE, el vecino espectral más cercano para el módulo JOE es FAM, el vecino espectral más cercano para el módulo TxRed es Cy5 y el vecino espectral más cercano para el módulo Cy5 es TxRed. Aunque los valores de corrección de la interferencia anteriores para cada módulo incluyen solo un factor, asociado al vecino espectral más cercano, en otros modos de realización o para otros módulos, se puede tener en cuenta más de un vecino espectral en el factor de corrección para un módulo. Se puede determinar un "vecino espectral más cercano" o, más ampliamente, un "vecino espectral cercano" basado en una distancia desde el pico de fluorescencia de un colorante objetivo al pico de fluorescencia de un colorante objetivo vecino. Véanse, por ejemplo, las figuras 13-14 que ilustran el pico de fluorescencia de diversos colorantes. Por ejemplo, los vecinos con picos de fluorescencia separados por una distancia inferior a una distancia umbral (por ejemplo, en nanómetros) pueden considerarse vecinos espectrales, identificándose el vecino más cercano como un vecino espectral más cercano. Una distancia umbral de ejemplo puede ser, por ejemplo, 50 nm. De forma alternativa o adicional, se podría determinar si se incluye un factor de corrección para un colorante vecino basado en un umbral por encima de un valor basal. Es decir, cuando las señales detectadas por un módulo particular muestran interferencia atribuible a un colorante diferente que excede de una cantidad umbral (por ejemplo, un 10 % del valor basal), el valor de corrección para ese módulo incluirá un término que excluye la interferencia. Cuando las señales muestran interferencia que está en un nivel por debajo del umbral, el valor de corrección puede no incluir un término para ese colorante. Dicho de otra manera, el valor de corrección puede considerarse una suma de productos de factores de corrección y señales para cada canal. Los factores de corrección, sin embargo, serán cero a menos que la interferencia determinada durante el proceso de calibración exceda del umbral.

30 Se puede determinar un valor de corrección promedio para cada canal tomando un promedio de los valores de corrección obtenidos para cada uno de la pluralidad de ciclos (358). Se pueden usar ciclos que ocurren, por ejemplo, de 3 a 5 ciclos después de un ciclo umbral C_t , y continúan durante algunos ciclos posteriores. Como un ejemplo, los valores de corrección de la interferencia de los ciclos 30-35 pueden promediarse. Como otro ejemplo, los valores de corrección de la interferencia de los ciclos 30-45 pueden promediarse. Como otro ejemplo más, los valores de corrección de la interferencia de los ciclos 35-50 pueden promediarse.

40 Los valores de corrección de la interferencia promediados para cada módulo se pueden almacenar como parámetros en la memoria (360). Por ejemplo, los valores de corrección de la interferencia promediados para cada módulo pueden almacenarse en el módulo 139 de base de datos del módulo 21 de adquisición de datos. Como otro ejemplo, los valores de corrección de la interferencia promediados para cada módulo pueden almacenarse en la unidad 23 de control del dispositivo 10.

45 Cada colorante tiene diferentes valores de corrección de la interferencia. Si los módulos 16 se cambian para diferentes módulos, se usan nuevos valores de corrección de la interferencia para los colorantes que se utilizarán con los nuevos módulos, y dichos valores pueden determinarse de manera similar a la descrita anteriormente y programarse en una memoria no volátil del dispositivo 21 de adquisición de datos y/o dispositivo 10 de detección de fluorescencia.

50 La figura 25 es un diagrama de flujo que ilustra un método ejemplar mediante el cual el dispositivo 21 de adquisición de datos recoge y analiza datos de amplificación por PCR. Aunque se describe a efectos de ejemplo con respecto a la amplificación por PCR, las técnicas mostradas en la figura 25 son fácilmente aplicables a otras técnicas para el análisis de amplificación de ácidos nucleicos. El dispositivo 21 de adquisición de datos inicializa la amplificación por PCR (362). Por ejemplo, el dispositivo 21 de adquisición de datos (por ejemplo, el módulo 135 de control) controla el funcionamiento del dispositivo 10 de detección de fluorescencia según los parámetros almacenados en el módulo 139 de base de datos o introducidos por un usuario 149 a través del módulo 137 de

interfaz. Los parámetros pueden incluir los factores de corrección de la interferencia determinados de acuerdo con las técnicas descritas en el presente documento, tal como mediante el método analizado en la figura 24. En algunos aspectos, el dispositivo 21 de adquisición de datos puede configurarse con los valores de corrección de la interferencia durante la fabricación. Los parámetros también pueden incluir, por ejemplo, tipo y número de muestra, tipo de marcador fluorescente, longitud de onda del detector, número de ciclo, etapas del ciclo, perfiles de temperatura del ciclo y tasas de rampa de temperatura, velocidades de rotación del disco, tiempos de detección de fluorescencia y similares.

5

El dispositivo 21 de adquisición de datos inicializa la amplificación por PCR, por ejemplo, emitiendo órdenes a la unidad 23 de control que dirige el dispositivo 10 de detección de fluorescencia para preparar una nueva sesión de amplificación por PCR basada en los parámetros de funcionamiento especificados por el usuario. Además, el dispositivo 21 de adquisición de datos puede inicializar uno o más archivos para el almacenamiento de los datos de la curva de amplificación que se recibirán del dispositivo 10 de detección de fluorescencia.

10

En respuesta, la unidad 23 de control adquiere datos de amplificación por PCR (364) usando módulos 16 ópticos y detector 18. La unidad 23 de control puede adquirir datos de fluorescencia durante cada período de interrogación de PCR, y puede recoger datos durante cierto período de tiempo, tal como, por ejemplo, cierto número de revoluciones del disco 13, para cada período de interrogación de PCR. La unidad 23 de control puede integrar la fluorescencia detectada por el detector 18 para producir un único valor de fluorescencia para cada período de interrogación de PCR, o puede adquirir y retener una pluralidad de valores de fluorescencia para un único período de interrogación de PCR. La unidad 23 de control puede guardar en una memoria intermedia los datos de amplificación hasta el final de la sesión de amplificación por PCR o puede comunicar los datos al dispositivo 21 de adquisición de datos, que puede almacenar los datos de amplificación en el módulo 139 de base de datos para amplificación posterior o puede transferir los datos de amplificación al módulo 143 de análisis para amplificación sustancialmente en tiempo real.

15

20

25

En cualquier caso, el módulo 143 de análisis del dispositivo 21 de adquisición de datos aplica los valores de corrección de la interferencia a los datos de amplificación por PCR (366). Por ejemplo, para obtener una señal corregida para un módulo en el que se elimina la interferencia detectada por el módulo debido a un colorante asociado a un vecino espectral, el módulo 143 de análisis puede obtener una señal corregida por el fondo para el módulo, y sustrae de la señal corregida por el fondo el producto del valor de corrección para el vecino espectral y una señal del canal del vecino espectral más cercano. Este cálculo está representado por la ecuación 6:

30

$$\text{señal}_{cor, i} = \text{señal}_{bk, i} - \text{cor}_i(\text{señal}_j) \quad (6)$$

en la que el índice i corresponde a un módulo con un colorante objetivo, el índice j corresponde a un módulo con un colorante que es un vecino espectral más cercano al colorante objetivo, y la señal bk denota una señal corregida por el fondo. Por ejemplo, para el canal FAM, que tiene el canal JOE como su vecino más cercano, la ecuación 6 daría como resultado el siguiente cálculo:

35

40

$$\text{señal}_{cor, FAM} = \text{señal}_{bk, FAM} - \text{cor}_{FAM}(\text{señal}_{JOE}).$$

El módulo 137 de interfaz actualiza una pantalla basada en los datos corregidos (367). En algunos modos de realización, el módulo 137 de interfaz puede mostrar los datos corregidos en un gráfico, como una entrada en una tabla, o en cualquier otro formato adecuado. En otros modos de realización, el módulo 137 de interfaz puede mostrar un mensaje basado en los datos corregidos en una pantalla del dispositivo 36 de salida. Por ejemplo, el módulo 143 de análisis puede interpretar la determinación de un valor de C_t para significar simplemente que cierto segmento de ácido nucleico está presente en la muestra que se ha sometido a amplificación por PCR. El módulo 137 de interfaz puede mostrar a continuación un mensaje que indica la presencia de este segmento de ácido nucleico en la muestra. A la inversa, si un valor de C_t no está determinado por un módulo dado para la muestra (es decir, no se ha producido la amplificación), el módulo 143 de análisis puede interpretar esto para indicar que ningún ácido nucleico con cierta secuencia está presente en la muestra, y módulo 137 de interfaz puede mostrar un mensaje correspondiente. Esto puede ser deseable en la amplificación de ácidos nucleicos utilizada para determinar la presencia de un patógeno, por ejemplo. Según los datos corregidos, el módulo 143 de análisis puede identificar e interpretar una o más de otras características de las curvas de amplificación, y puede presentar los resultados a un usuario.

45

50

55

Ejemplo 2

El siguiente ejemplo ilustra la aplicación del algoritmo de compensación de la interferencia espectral. Se realizó una serie de cuatro reacciones por cuadruplicado singleplex en el siguiente diseño:

60

Pocillos 1-4, 500 copias de molde de ADNc volumen de reacción de 10 microlitros, sonda marcada con FAM solamente.

Pocillos 5-8, 500 copias de ADNc, sonda marcada con JOE solamente.

Pocillos 9-12, 500 copias de ADNc, sonda marcada con Texas Red solamente.

5 Pocillos 13-16, 3000 copias de ADNc, sonda marcada con Cy5 solamente.

Por simplicidad y claridad, los siguientes gráficos muestran datos de los pocillos 1, 5, 9 y 13.

10 Las figuras 26A-26C son gráficos que ilustran curvas de amplificación basadas en rastros de datos singleplex obtenidos al usar una sonda FAM. Las curvas de amplificación representan una intensidad de una muestra detectada por fluorescencia frente a cada uno de una pluralidad de periodos de interrogación de PCR. La figura 26A es un gráfico que ilustra los datos brutos detectados por una detección de canal FAM singleplex en el que se utiliza una sonda de FAM para el análisis de una muestra de ácido nucleico.

15 Después de adquirir los datos singleplex, se sustrae el fondo a los datos brutos. Esto se puede hacer de diferentes maneras. En este ejemplo, el fondo de cada pocillo se calcula como el promedio de los datos adquiridos durante los ciclos 2-6 para ese pocillo. Se puede elegir un intervalo más amplio que este, porque no hay señal de amplificación hasta aproximadamente el ciclo 25. La figura 26B es un gráfico que ilustra una curva de amplificación basada en los datos de detección del canal FAM que se han corregido por el fondo. En
20 comparación con la figura 26A, los datos en la figura 26B se desplazan hacia abajo con respecto al eje y.

De acuerdo con las técnicas descritas anteriormente, los factores de corrección de la interferencia se calculan, por ejemplo, mediante la unidad 23 de control del dispositivo 10, o mediante el dispositivo 21 de adquisición de datos. Los factores de corrección calculados en este ejemplo son: $cor_{FAM} = 0,09408$; $cor_{JOE} = 0,06402$; $cor_{TxRed} = 0$; $cor_{Cy5} = 0,1202$.
25

La figura 26C es un gráfico que ilustra una curva de amplificación basada en datos de detección de canal FAM que han sido corregidos por el fondo y a los que se les ha aplicado corrección de la interferencia.

30 Las figuras 26A-26C muestran poca o ninguna interferencia en los datos de detección del canal FAM atribuidos a cualquiera de las sondas que no sean la sonda FAM, tanto antes como después de aplicar la corrección.

Las figuras 27A-27C son gráficos que ilustran curvas de amplificación basadas en rastros de datos singleplex obtenidos al usar una sonda JOE. La figura 27A es un gráfico que ilustra los datos brutos detectados por una
35 detección de canal JOE singleplex en el que se utiliza una sonda de JOE para el análisis de una muestra de ácido nucleico. Como se muestra en la figura 27A, la detección del canal JOE muestra una interferencia significativa atribuida a la sonda marcada con FAM.

La figura 27B es un gráfico que ilustra una curva de amplificación basada en los datos de detección del canal JOE que se han corregido por el fondo. En comparación con la figura 27A, los datos en la figura 27B se
40 desplazan hacia abajo con respecto al eje y. De la figura 27C, un gráfico que ilustra una curva de amplificación basada en la detección del canal JOE que ha sido corregida por el fondo y a la cual se le ha aplicado corrección de la interferencia, se puede ver que la aplicación de los factores de corrección ha reducido o eliminado la interferencia.
45

Las figuras 28A-28C son gráficos que ilustran curvas de amplificación basadas en rastros de datos singleplex obtenidos al usar una sonda TxRed. La figura 28A es un gráfico que ilustra los datos brutos detectados por una
50 detección de canal TxRed singleplex en el que se utiliza una sonda de TxRed para el análisis de una muestra de ácido nucleico. La figura 28B es un gráfico que ilustra una curva de amplificación basada en los datos de detección del canal TxRed que se han corregido por el fondo. La figura 28C es un gráfico que ilustra una curva de amplificación basada en datos de detección de canal TxRed que han sido corregidos por el fondo y a los que se les ha aplicado corrección de la interferencia. Las figuras 28A-28C muestran poca o ninguna interferencia en la detección del canal TxRed debido a las sondas distintas a la sonda marcada con TxRed.

55 Las figuras 29A-29C son gráficos que ilustran curvas de amplificación basadas en rastros de datos singleplex obtenidos al usar una sonda Cy5. La figura 29A es un gráfico que ilustra los datos brutos detectados por una detección de canal Cy5 singleplex en el que se utiliza una sonda de Cy5 para el análisis de una muestra de ácido nucleico. La figura 29B es un gráfico que ilustra una curva de amplificación basada en los datos de detección del canal Cy5 que se han corregido por el fondo. La figura 29C es un gráfico que ilustra una curva de amplificación
60 basada en datos de detección de canal Cy5 que han sido corregidos por el fondo y a los que se les ha aplicado corrección de la interferencia. Como se muestra en las figuras 29A-29C, la detección del canal Cy5 muestra una interferencia significativa atribuida a la sonda marcada con Texas Red. De la figura 29C, se puede ver que la aplicación de los factores de corrección ha reducido o eliminado la interferencia atribuible a una sonda TxRed en el canal Cy5.
65

La efectividad del algoritmo se puede demostrar, por ejemplo, comparando el ciclo umbral Ct de los datos antes y

después de que se haya aplicado la compensación de la interferencia espectral. El Ct puede identificarse aplicando una técnica de umbral manual o automática para identificar un ciclo correspondiente a un punto dentro de un período de crecimiento de los datos de amplificación. La técnica de umbral manual depende de que un usuario establezca la intensidad umbral de fluorescencia. Un módulo 143 de análisis del dispositivo 21 de adquisición de datos (figura 10) determina a continuación cuando los datos de amplificación cruzan este umbral y devuelve el ciclo en el que esto ocurre como el valor de Ct.

Si se selecciona la técnica de umbral automático, el módulo 143 de análisis determina automáticamente la intensidad umbral de fluorescencia. Por ejemplo, el módulo 143 de análisis puede determinar un promedio y una desviación estándar de la señal de fluorescencia en la región basal de la curva de amplificación. El módulo 143 de análisis puede establecer entonces el umbral como cierto número de desviaciones estándar por encima de la señal de fluorescencia basal promedio, tal como, por ejemplo, cinco desviaciones estándar por encima de la señal de fluorescencia promedio. Las técnicas de umbral se describen con más detalle en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0044826, titulada "AUTOMATIC THRESHOLD SETTING FOR QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION" (Configuración de umbral automático para reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa).

En algunos modos de realización, el módulo 143 de análisis puede permitir que el usuario elija una técnica de transformada de Fourier o una técnica de ajuste sigmoide doble para determinar un ciclo correspondiente a un punto dentro de un período de crecimiento de los datos de amplificación. La técnica de transformada de Fourier se describe en detalle en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0286587, titulada "METHODS FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF A NUCLEIC ACID AMPLIFICATION REACTION" (Métodos para análisis cuantitativo de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos), y la técnica de ajuste sigmoide doble se describe en detalle en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007/0143385, titulada "PCR ELBOW DETERMINATION BY USE OF A DOUBLE SIGMOID FUNCTION CURVE FIT WITH THE LEVENBERG-MARQUARDT ALGORITHM AND NORMALIZATION" (Determinación del ángulo en PCR mediante el uso de un ajuste de curva de función sigmoide con el algoritmo de Levenberg-Marquardt y normalización). En otros modos de realización, el módulo 143 de análisis también puede permitir que el usuario elija una técnica derivada como un mecanismo diferente para determinar un ciclo correspondiente a un punto dentro de un período de crecimiento de los datos de amplificación. En la técnica derivada, el módulo 143 de análisis puede calcular una derivada de orden $n^{\text{ésimo}}$ de los datos de amplificación, determinar un valor máximo, mínimo o cero de la derivada de orden $n^{\text{ésimo}}$, y generar el ciclo de PCR en el que se encuentra este valor de la derivada como el valor de Ct. Las técnicas derivadas se describen con más detalle en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2002/0028452, titulada "METHOD FOR QUANTIFICATION OF AN ANALYTE" (Método de cuantificación de un analito).

La tabla 2 a continuación muestra los ciclos umbral Ct calculados usando el método derivado en los datos brutos obtenidos en este ejemplo. Se esperaría que solo se notificara el Ct en los pocillos 1-4 para la sonda FAM, pocillos 5-8 para la sonda JOE, pocillos 9-12 para la sonda Texas Red y pocillos 13-16 para la sonda Cy5. Sin embargo, las partes sombreadas de la tabla 2 (módulo JOE, pocillos 1-4 y módulo Cy5, pocillos 9-12) corresponden a indicaciones de falsos positivos debido a la interferencia de los vecinos espectrales más cercanos.

TABLA 2

	FAM	JOE	TxRed	Cy5
Pocillos	Ct	Ct	Ct	Ct
1	26,501	26,322		
2	26,487	26,135		
3	26,492	26,557		
4	26,504	26,495		
5		26,174		
6		26,134		
7		26,604		
8		26,543		
9			27,272	26,930
10			27,428	27,142
11			27,353	27,377

12			27,455	27,256
13				32,540
14				32,198
15				32,486
16				32,225

La tabla 3 a continuación muestra los ciclos de umbral Ct después de aplicar las técnicas de compensación de la interferencia espectral. Como se muestra en la tabla 3, los falsos positivos han sido filtrados.

5 TABLA 3

	FAM	JOE	TxRed	Cy5
Pocillos	Ct	Ct	Ct	Ct
1	26,502			
2	26,488			
3	26,492			
4	26,504			
5		26,180		
6		26,131		
7		26,603		
8		26,504		
9			27,272	
10			27,428	
11			27,353	
12			27,455	
13				32,539
14				32,197
15				32,484
16				32,323

La tabla 4 a continuación muestra los ciclos umbral Ct calculados usando el método de ondículas en los datos brutos obtenidos en este ejemplo. De forma similar al ejemplo anterior, se esperaría que solo se notificara el Ct en los pocillos 1-4 para la sonda FAM, pocillos 5-8 para la sonda JOE, pocillos 9-12 para la sonda Texas Red y pocillos 13-16 para la sonda Cy5. Sin embargo, las partes sombreadas de la tabla 2 (módulo JOE, pocillos 1-4 y módulo Cy5, pocillos 9-12) corresponden a indicaciones de falsos positivos debido a la interferencia de los vecinos espectrales más cercanos.

10

TABLA 4

	FAM	JOE	TxRed	Cy5
Pocillos	Ct	Ct	Ct	Ct
1	25,22	25,25		
2	25,21	25,02		
3	25,28	25,14		
4	25,28	25,05		
5		25,20		
6		25,58		
7		25,78		

8		25,85		
9			25,83	26,03
10			26,15	26,28
11			25,97	26,18
12			26,25	26,29
13				30,15
14				29,72
15				30,09
16				29,78

La tabla 5 a continuación muestra el Ct después de aplicar las técnicas de compensación de la interferencia espectral al análisis de ondículas. Como se muestra en la tabla 5, los falsos positivos han sido filtrados.

5 TABLA 5

	FAM	JOE	TxRed	Cy5
Pocillos	Ct	Ct	Ct	Ct
1	25,22			
2	25,21			
3	25,29			
4	25,28			
5		25,20		
6		25,58		
7		25,78		
8		25,85		
9			25,83	
10			26,15	
11			25,97	
12			26,25	
13				30,15
14				29,72
15				30,08
16				29,79

La figura 30 es una pantalla de interfaz de usuario de ejemplo presentada a un usuario por un dispositivo de adquisición de datos. La pantalla incluye una parte 370 de control de compensación de la interferencia. En el ejemplo de la figura 30, la parte 370 de control permite al usuario activar o desactivar la función de compensación de la interferencia. En algunos modos de realización, el acceso a la parte 370 de control de compensación de la interferencia puede ser específico del usuario en función de los privilegios del usuario. Por ejemplo, en algunos modos de realización, un usuario debe tener un estado de administrador para poder activar o desactivar la función de compensación de la interferencia, y si el usuario no tiene un estado de administrador, al usuario se le impide ajustar los parámetros de compensación de la interferencia. En algunos modos de realización, un usuario que tiene un estado particular también puede ser capaz de configurar o cambiar los factores de compensación. Por ejemplo, se puede presentar una pantalla de interfaz de usuario diferente que proporciona una interfaz de gestión para permitir al usuario seleccionar parámetros para uno o más instrumentos, incluyendo los módulos 16 del dispositivo 10. Por ejemplo, dicha interfaz de gestión puede presentar una tabla de matriz que permite al usuario introducir coeficientes que controlan la compensación de la interferencia.

20 Se han descrito diversos modos de realización de la invención. Estos y otros modos de realización están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método de compensación para interferencia espectral en amplificación multiplex de ácidos nucleicos, que comprende:
- 5 un proceso de calibración que comprende:
- realizar al menos una amplificación de ácido nucleico singleplex de una muestra de ácido nucleico
- 10 usando una sonda de detección, en el que la amplificación de ácido nucleico se produce durante una pluralidad de periodos de interrogación;
- a partir de la amplificación de ácido nucleico, adquirir datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente para cada uno de la pluralidad de periodos de interrogación; y
- 15 - en función de los datos de amplificación, determinar un valor de corrección de la interferencia asociado a un vecino espectral cercano a la sonda de detección para reducir la interferencia espectral del vecino espectral cercano;
- 20 comprendiendo además el método un análisis de la amplificación de ácido nucleico que incluye
- aplicar el valor de corrección de la interferencia obtenido del proceso de calibración a los datos de amplificación recogidos de la amplificación multiplex de ácidos nucleicos de muestras de ácido nucleico,
- 25 en el que el valor de corrección de la interferencia determinado es la proporción de una señal detectada para el vecino espectral cercano con respecto a la señal detectada para los datos de amplificación de la sonda de detección,
- 30 en el que el vecino espectral cercano se determina basándose en una distancia desde un pico de fluorescencia del colorante objetivo de la sonda de detección hasta el pico de fluorescencia de un colorante objetivo vecino,
- en el que el pico de fluorescencia del colorante objetivo de la sonda de detección y el pico de fluorescencia del colorante objetivo del vecino espectral cercano están separados por una distancia menor que una distancia umbral, y
- 35 en el que aplicar el valor de corrección de la interferencia a los datos de amplificación comprende:
- sustraer una señal de fondo de la señal detectada para los datos de amplificación para obtener una señal corregida por el fondo; y
- 40 - sustraer, de la señal corregida por el fondo, un producto del valor de corrección de la interferencia y la señal detectada por el vecino espectral cercano.
- 45 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- generar una curva de amplificación a partir de los datos de amplificación, representando la curva de amplificación el crecimiento de la muestra de ácido nucleico frente al período de interrogación; y
- 50 antes de determinar el valor de corrección de la interferencia asociado al vecino espectral cercano, determinar el vecino espectral cercano basado en una distancia umbral entre un pico de fluorescencia para el canal configurado para detectar datos de amplificación debido a la sonda de detección y un pico de fluorescencia para el vecino espectral cercano .
- 55 3. El método de la reivindicación 1, en el que la amplificación de ácido nucleico usa una pluralidad de módulos ópticos, cada uno asociado a un canal diferente para la detección óptica de diferentes colorantes fluorescentes.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además calibrar un dispositivo de amplificación de ácido nucleico que realiza la amplificación de ácido nucleico con el valor de corrección de la interferencia determinado.
- 60 5. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- sustraer una señal de fondo de la señal detectada para los datos de amplificación para obtener una señal corregida por el fondo para la sonda;
- 65 calcular una proporción de una señal detectada para el vecino espectral cercano con respecto a la señal corregida por el fondo detectada para la sonda para cada uno de una pluralidad de periodos de interrogación

seleccionados;

promediar las proporciones calculadas a través de la pluralidad de períodos de interrogación seleccionados; e

5 identificar el promedio de las proporciones calculadas como el valor de corrección de la interferencia para la sonda.

6. El método de la reivindicación 5, en el que los periodos de interrogación seleccionados comprenden períodos de interrogación seleccionados de aquellos períodos de interrogación que se producen después de un ciclo umbral Ct.

7. Método de compensación para interferencia espectral en amplificación multiplex de ácidos nucleicos, que comprende:

15 - realizar una amplificación multiplex de ácidos nucleicos de una primera muestra de ácido nucleico en un análisis de amplificación de ácido nucleico, en el que la amplificación multiplex de ácidos nucleicos comprende una pluralidad de periodos de interrogación;

20 - a partir de la amplificación de ácido nucleico, adquirir datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente para cada uno de la pluralidad de periodos de interrogación;

- aplicar un valor de corrección de la interferencia a los datos de amplificación para generar datos de amplificación modificados en los que se reducen las señales de interferencia espectral de un vecino espectral cercano, en el que aplicar el valor de corrección de la interferencia a los datos de amplificación comprende:

25 sustraer una señal de fondo de la señal detectada para los datos de amplificación para obtener una señal corregida por el fondo; y

30 sustraer, de la señal corregida por el fondo, un producto del valor de corrección de la interferencia y la señal detectada por el vecino espectral cercano,

en el que el valor de corrección de la interferencia se deriva a partir de la amplificación multiplex de ácidos nucleicos de una segunda muestra de ácido nucleico en un proceso de calibración; y

35 - mostrar los datos de amplificación modificados,

en el que el valor de corrección de la interferencia es la proporción de una señal para el vecino espectral cercano con respecto a la señal para los datos de amplificación de la sonda de detección,

40 en el que el vecino espectral cercano se determina basándose en una distancia desde un pico de fluorescencia del colorante objetivo de la sonda de detección hasta el pico de fluorescencia de un colorante objetivo vecino,

45 en el que el pico de fluorescencia del colorante objetivo de la sonda de detección y el pico de fluorescencia del colorante objetivo del vecino espectral cercano están separados por una distancia menor que una distancia umbral.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el valor de corrección de la interferencia se determina calculando una proporción de una señal detectada para el vecino espectral cercano con respecto a una señal corregida por el fondo detectada para los datos de amplificación de la sonda de detección para cada uno de una pluralidad de períodos de interrogación seleccionados, y promediando las proporciones calculadas a través de la pluralidad de períodos de interrogación seleccionados.

9. El método de la reivindicación 7, en el que aplicar el valor de corrección de la interferencia comprende aplicar el valor de corrección de la interferencia con un dispositivo de amplificación multiplex de ácidos nucleicos que realiza la amplificación multiplex de ácidos nucleicos.

10. El método de la reivindicación 7, en el que aplicar el valor de corrección de la interferencia comprende aplicar el valor de corrección de la interferencia con un dispositivo de amplificación en comunicación con un dispositivo de amplificación multiplex de ácidos nucleicos que realiza la amplificación multiplex de ácidos nucleicos.

60 11. El método de la reivindicación 7, en el que la amplificación de ácido nucleico usa una pluralidad de módulos ópticos, cada uno asociado a un canal diferente para la detección óptica de diferentes colorantes fluorescentes.

65 12. Dispositivo de detección para compensación de interferencia espectral en amplificación multiplex de ácidos nucleicos, que comprende:

un motor para hacer girar un disco que tiene una pluralidad de cámaras de proceso que contienen cada una una muestra respectiva y uno o más colorantes fluorescentes;

una pluralidad de módulos ópticos; y

5

un alojamiento que tiene una pluralidad de ubicaciones adaptadas para recibir los módulos ópticos,

en el que cada uno de la pluralidad de módulos ópticos incluye un canal óptico que tiene una fuente de luz seleccionada para uno diferente de los colorantes y una lente para capturar luz fluorescente emitida desde el disco; y

10

un dispositivo de adquisición de datos acoplado al dispositivo de detección, en el que el dispositivo de adquisición de datos está configurado para aplicar un valor de corrección de la interferencia para cada uno de la pluralidad de módulos ópticos en un análisis de amplificación de ácido nucleico para reducir la interferencia espectral asociada a un vecino espectral cercano para ese módulo óptico;

15

en el que aplicar el valor de corrección de la interferencia a los datos de amplificación comprende:

sustraer una señal de fondo de la señal detectada para los datos de amplificación para obtener una señal corregida por el fondo; y

20

sustraer, de la señal corregida por el fondo, un producto del valor de corrección de la interferencia y la señal detectada por el vecino espectral cercano,

25

en el que el valor de corrección de la interferencia se deriva en un proceso de calibración realizando un análisis basado en datos de amplificación de una amplificación de ácido nucleico de una muestra de ácido nucleico usando una sonda de detección,

30

en el que la amplificación de ácido nucleico ocurre durante una pluralidad de periodos de interrogación, y

en el que el análisis comprende adquirir los datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente para cada uno de la pluralidad de periodos de interrogación, y determinar un valor de corrección de la interferencia asociado al vecino espectral cercano basado en los datos de amplificación,

35

en el que el valor de corrección de la interferencia es la proporción de una señal detectada para el vecino espectral cercano con respecto a la señal detectada para los datos de amplificación de la sonda de detección,

en el que el vecino espectral cercano se determina basándose en una distancia desde un pico de fluorescencia del colorante objetivo de la sonda de detección hasta el pico de fluorescencia de un colorante objetivo vecino,

40

en el que el pico de fluorescencia del colorante objetivo de la sonda de detección y el pico de fluorescencia del colorante objetivo del vecino espectral cercano están separados por una distancia menor que una distancia umbral.

45

13. Dispositivo de detección para compensación de interferencia espectral en amplificación multiplex de ácidos nucleicos, que comprende:

un motor para hacer girar un disco que tiene una pluralidad de cámaras de proceso que contienen cada una una muestra respectiva y uno o más colorantes fluorescentes;

50

una pluralidad de módulos ópticos;

un alojamiento que tiene una pluralidad de ubicaciones adaptadas para recibir los módulos ópticos,

55

en el que cada uno de los módulos ópticos incluye un canal óptico que tiene una fuente de luz seleccionada para uno diferente de los colorantes y una lente para capturar luz fluorescente emitida desde el disco; y

una unidad de control, en la que la unidad de control está configurada para aplicar valores de corrección de la interferencia para cada uno de la pluralidad de módulos ópticos en un análisis de amplificación de ácido nucleico para reducir la interferencia espectral asociada a los vecinos espectrales cercanos para ese módulo óptico,

60

en el que aplicar el valor de corrección de la interferencia a los datos de amplificación comprende:

sustraer una señal de fondo de la señal detectada para los datos de amplificación para obtener una señal corregida por el fondo; y

65

sustraer, de la señal corregida por el fondo, un producto del valor de corrección de la interferencia y la señal detectada por el vecino espectral cercano,

5 en el que cada uno de los valores de corrección de la interferencia se deriva en un proceso de calibración realizando un análisis basado en datos de amplificación de una amplificación de ácido nucleico de una muestra de ácido nucleico usando una sonda de detección,

en el que la amplificación de ácido nucleico ocurre durante una pluralidad de periodos de interrogación, y

10 en el que el análisis comprende adquirir los datos de amplificación que indican una cantidad de ácido nucleico presente para cada uno de la pluralidad de periodos de interrogación, y determinar cada uno de los valores de corrección de la interferencia asociado al vecino espectral cercano basado en los datos de amplificación,

15 en el que el valor de corrección de la interferencia determinado es la proporción de la señal detectada para el vecino espectral cercano con respecto a la señal detectada para los datos de amplificación de la sonda de detección,

20 en el que el vecino espectral cercano se determina basándose en una distancia desde un pico de fluorescencia del colorante objetivo de la sonda de detección hasta el pico de fluorescencia de un colorante objetivo vecino,

en el que el pico de fluorescencia del colorante objetivo de la sonda de detección y el pico de fluorescencia del colorante objetivo del vecino espectral cercano están separados por una distancia menor que una distancia umbral.

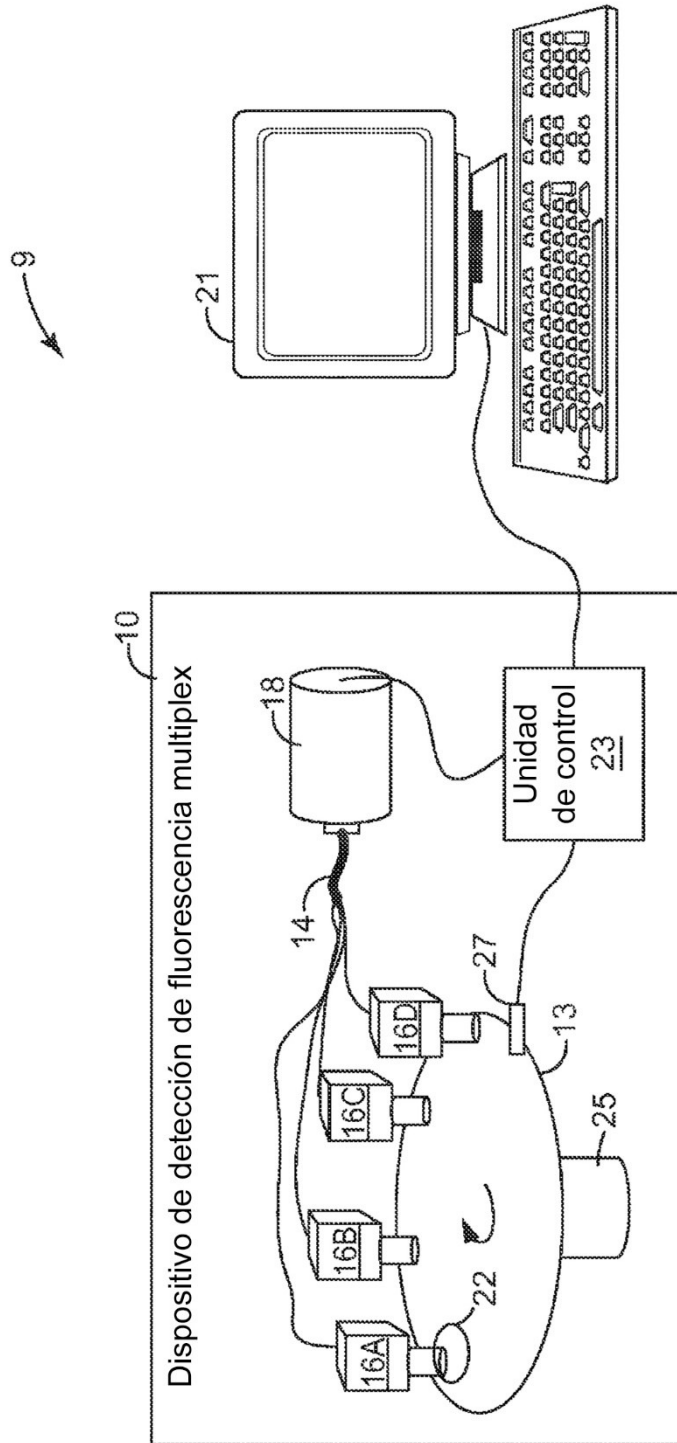


Fig. 1

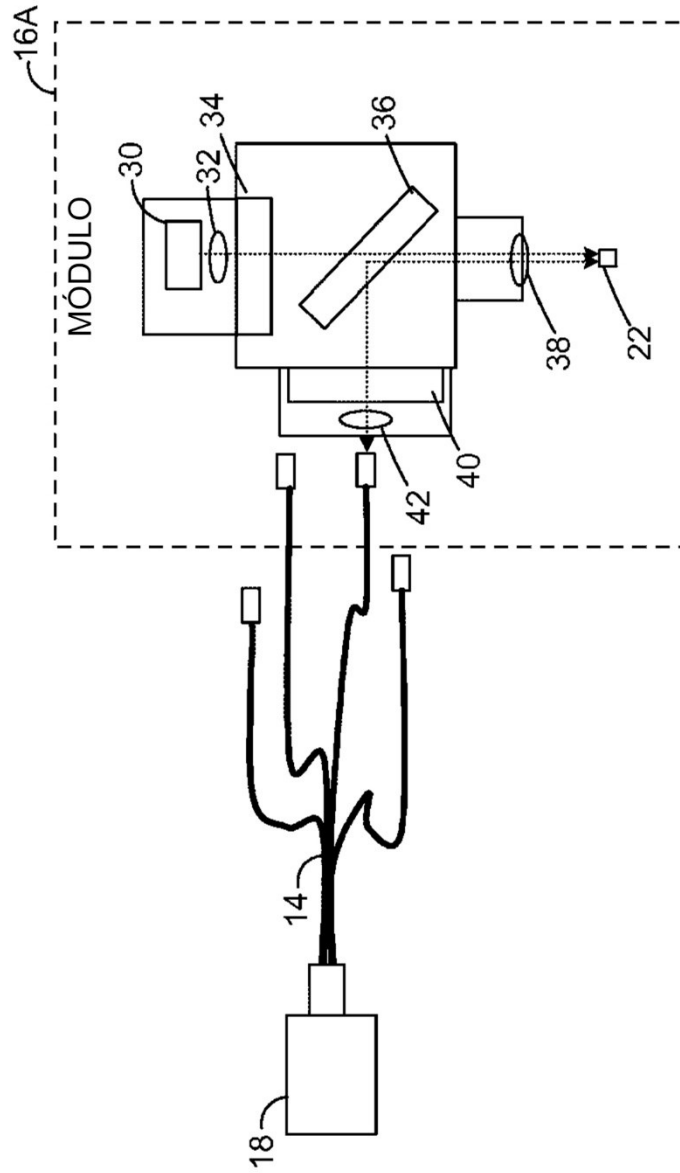


Fig. 2

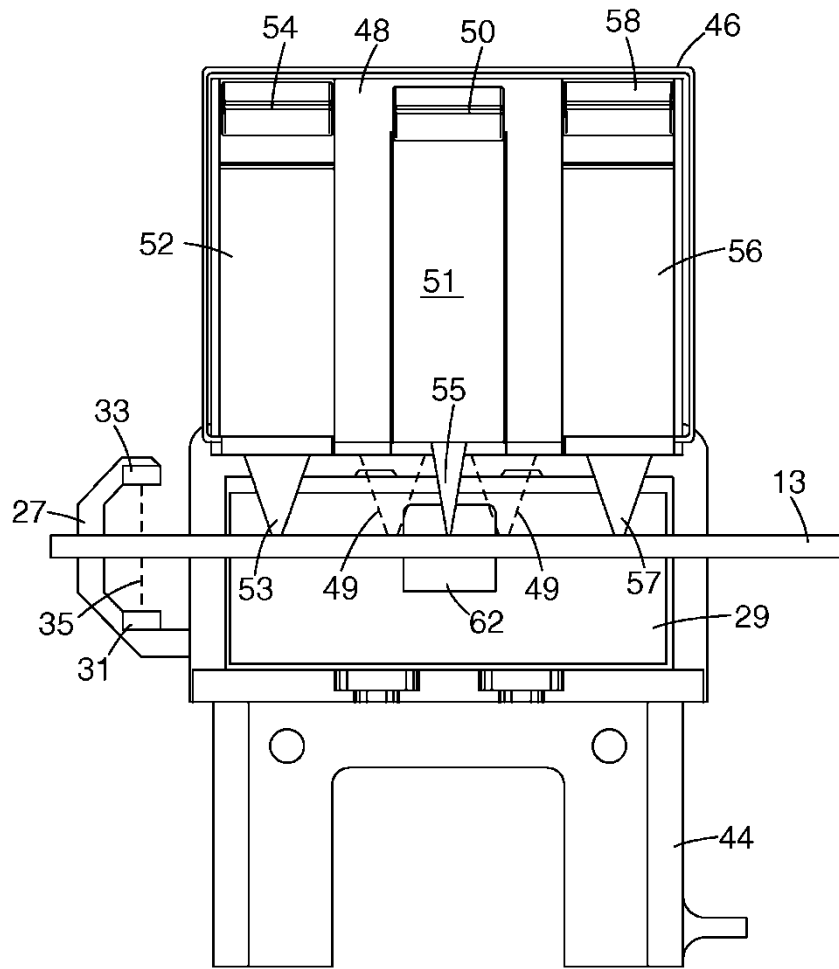


Fig. 3

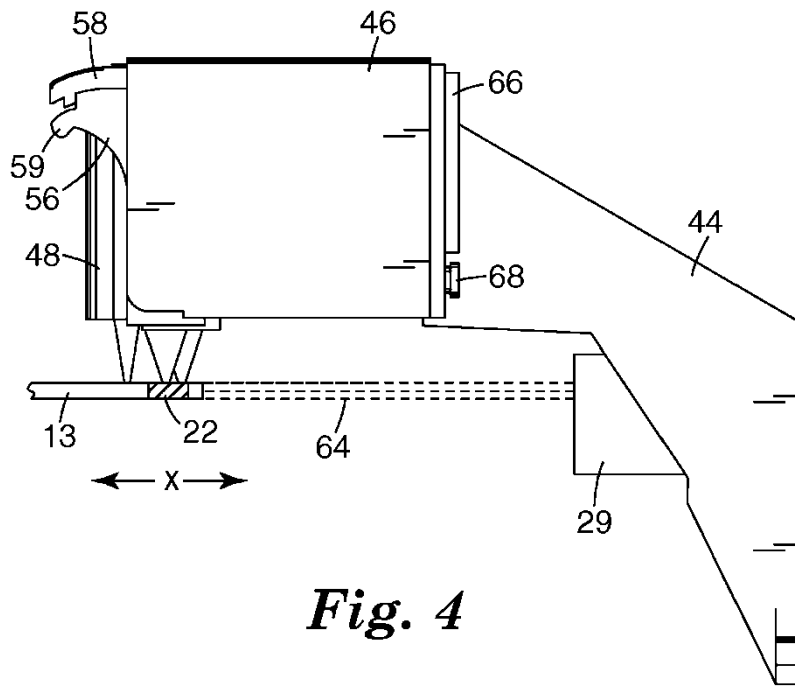


Fig. 4

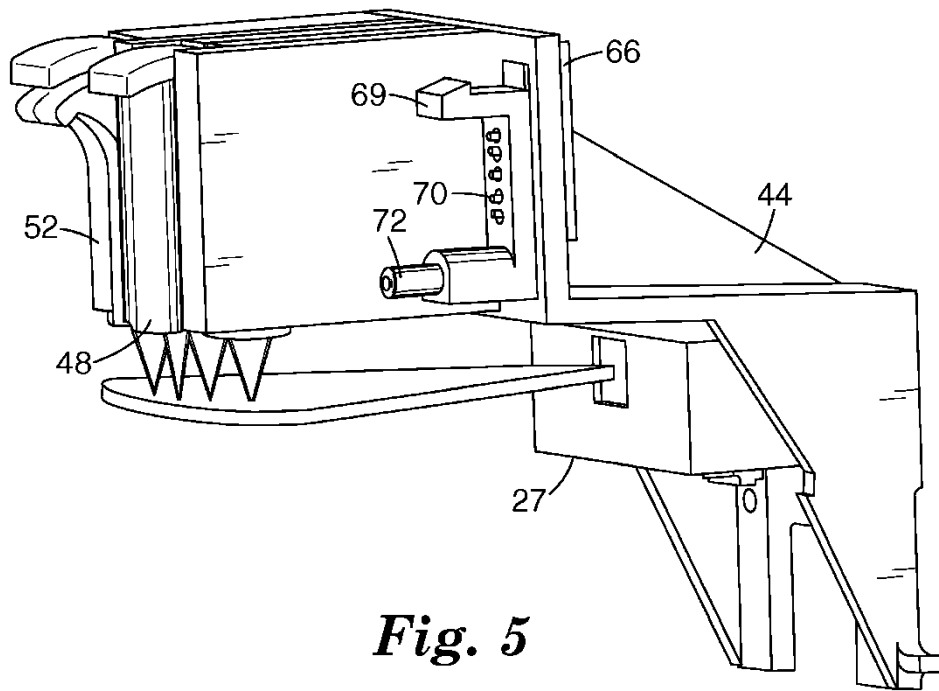


Fig. 5

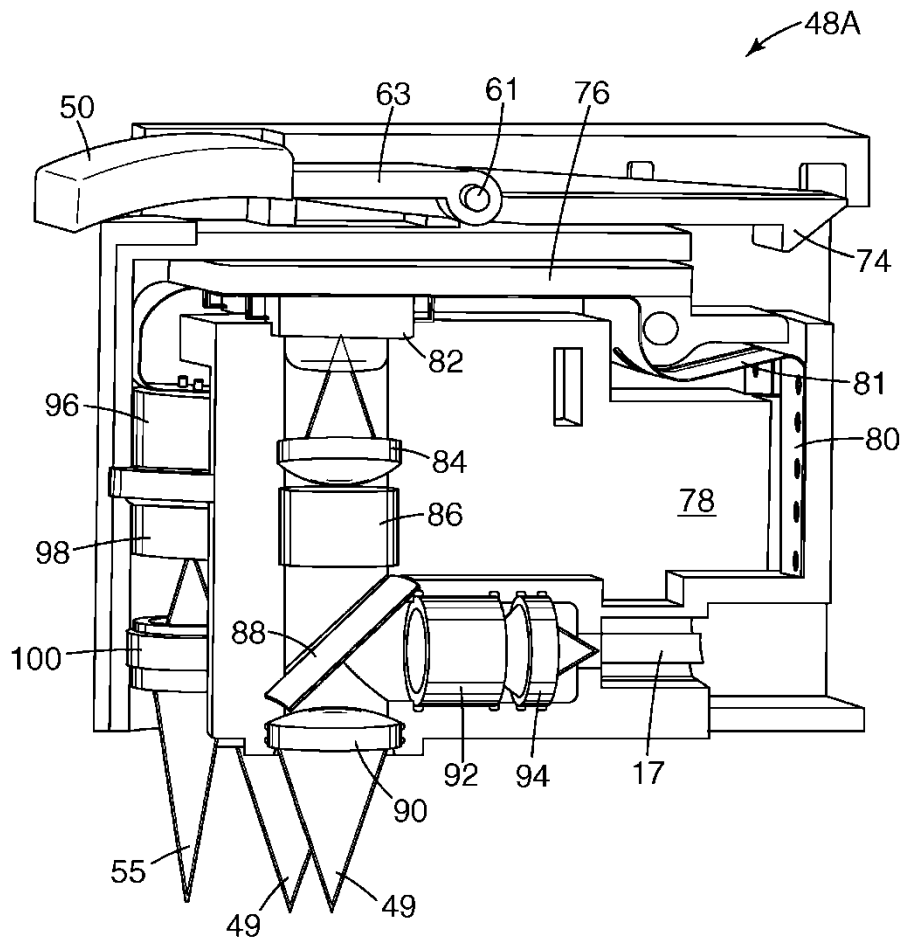


Fig. 6A

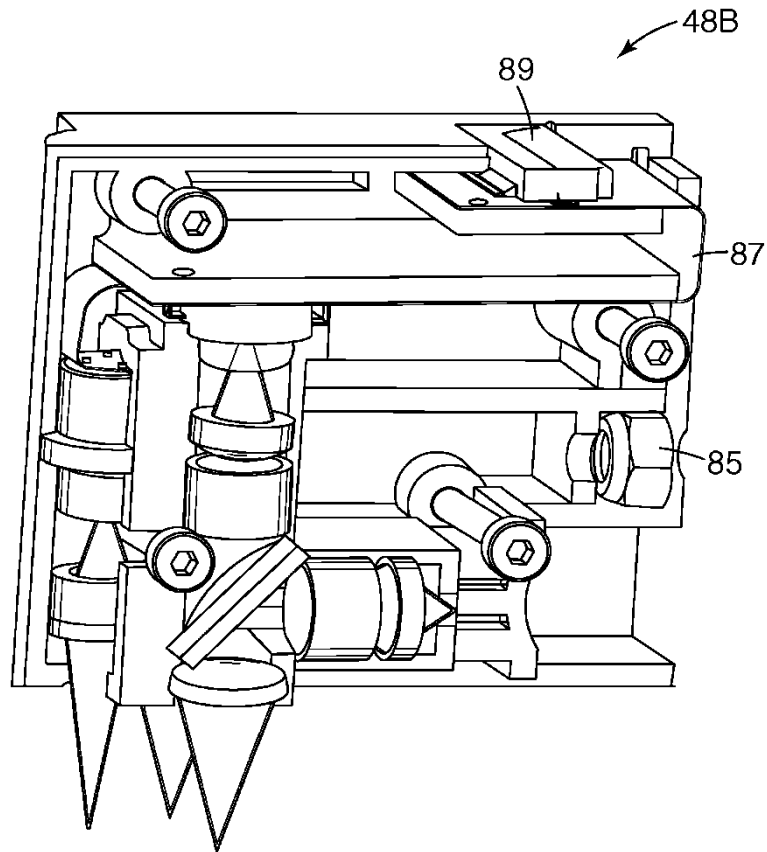


Fig. 6B

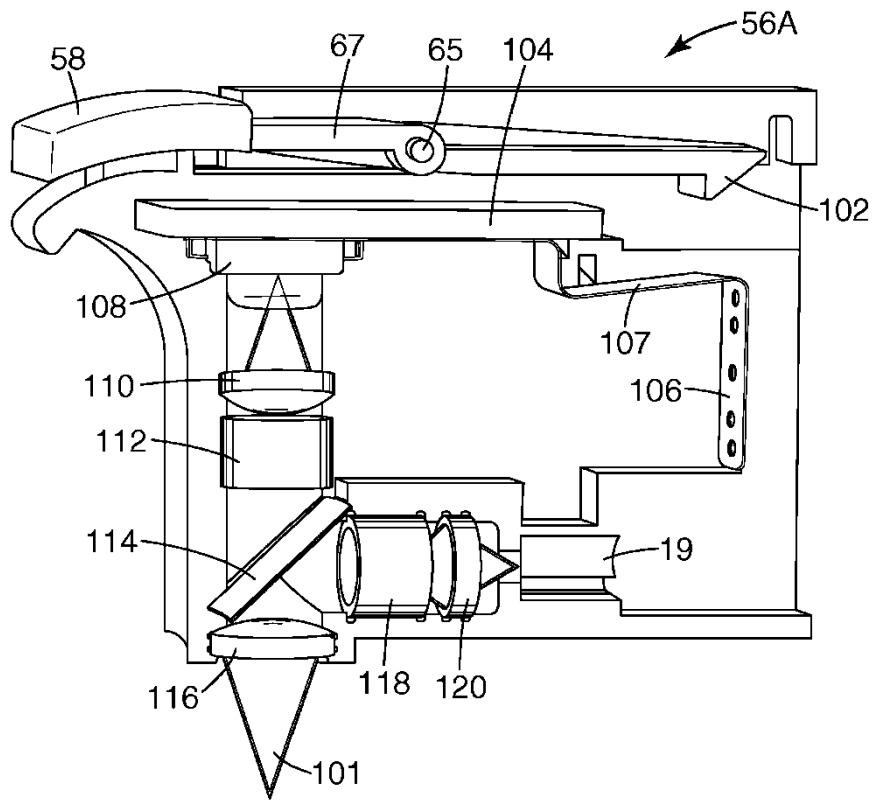


Fig. 7A

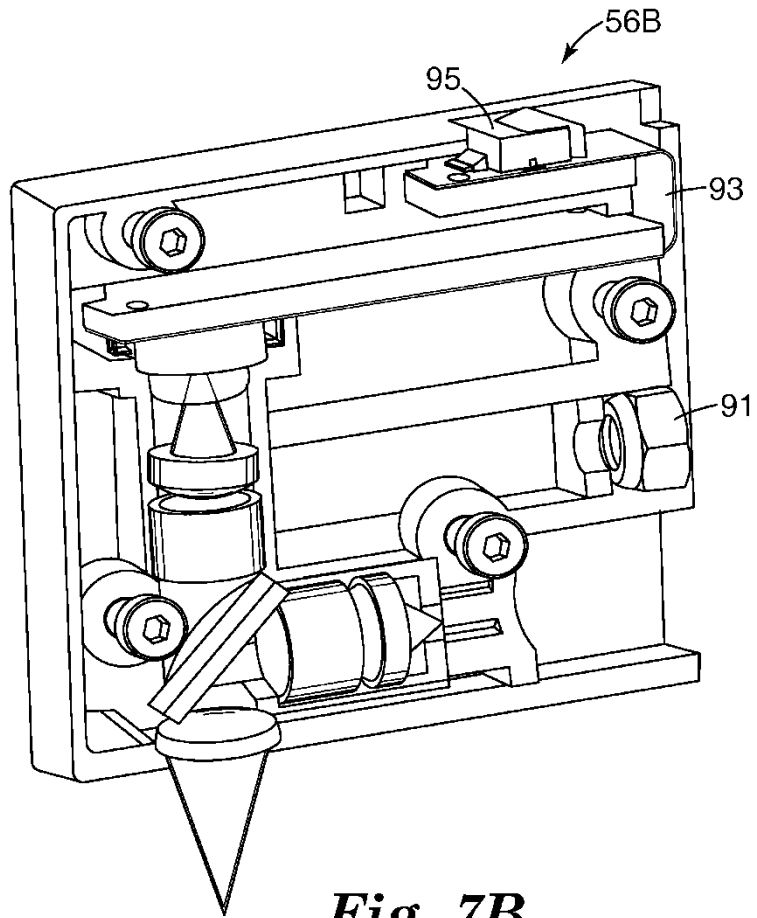


Fig. 7B

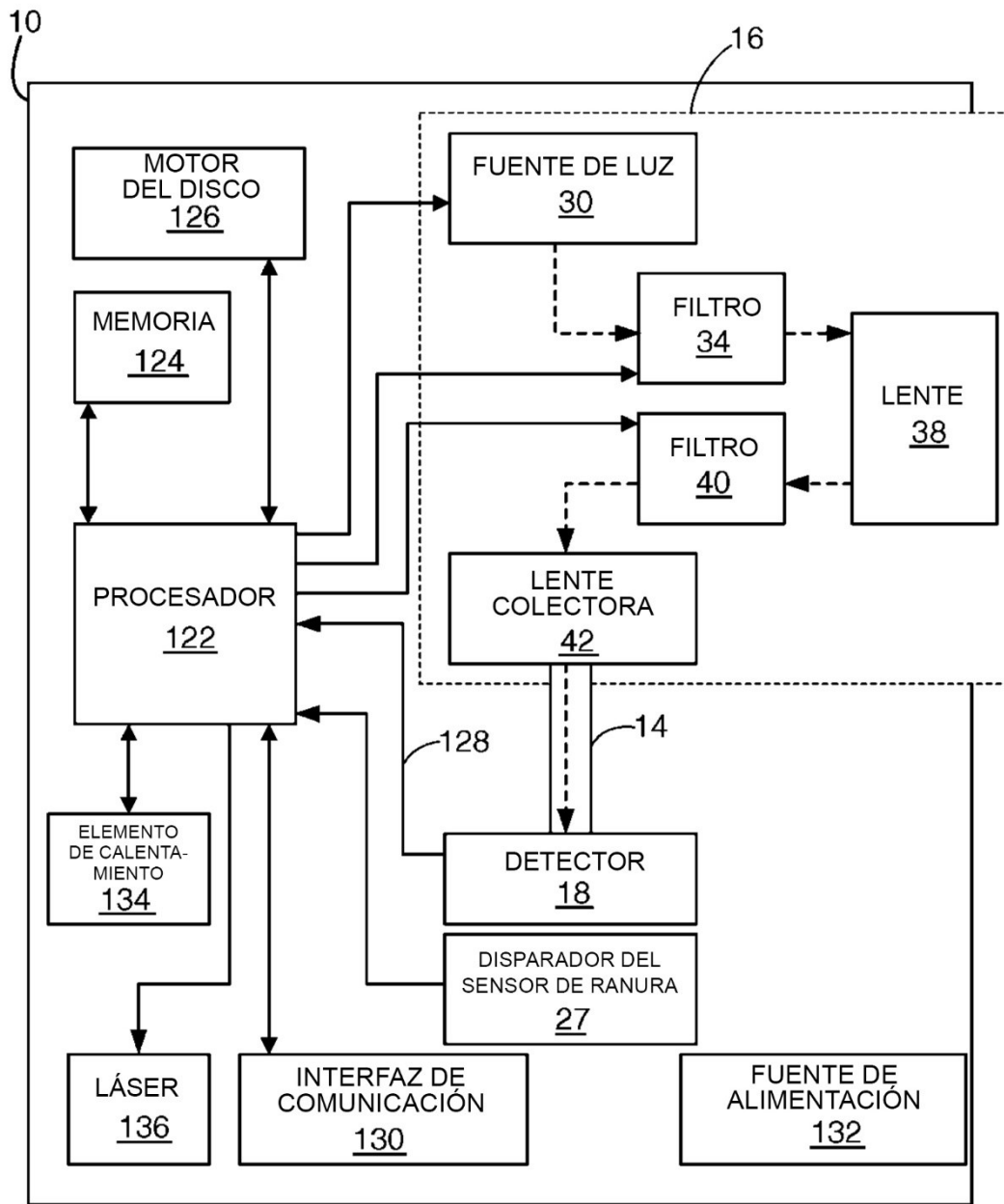


Fig. 8

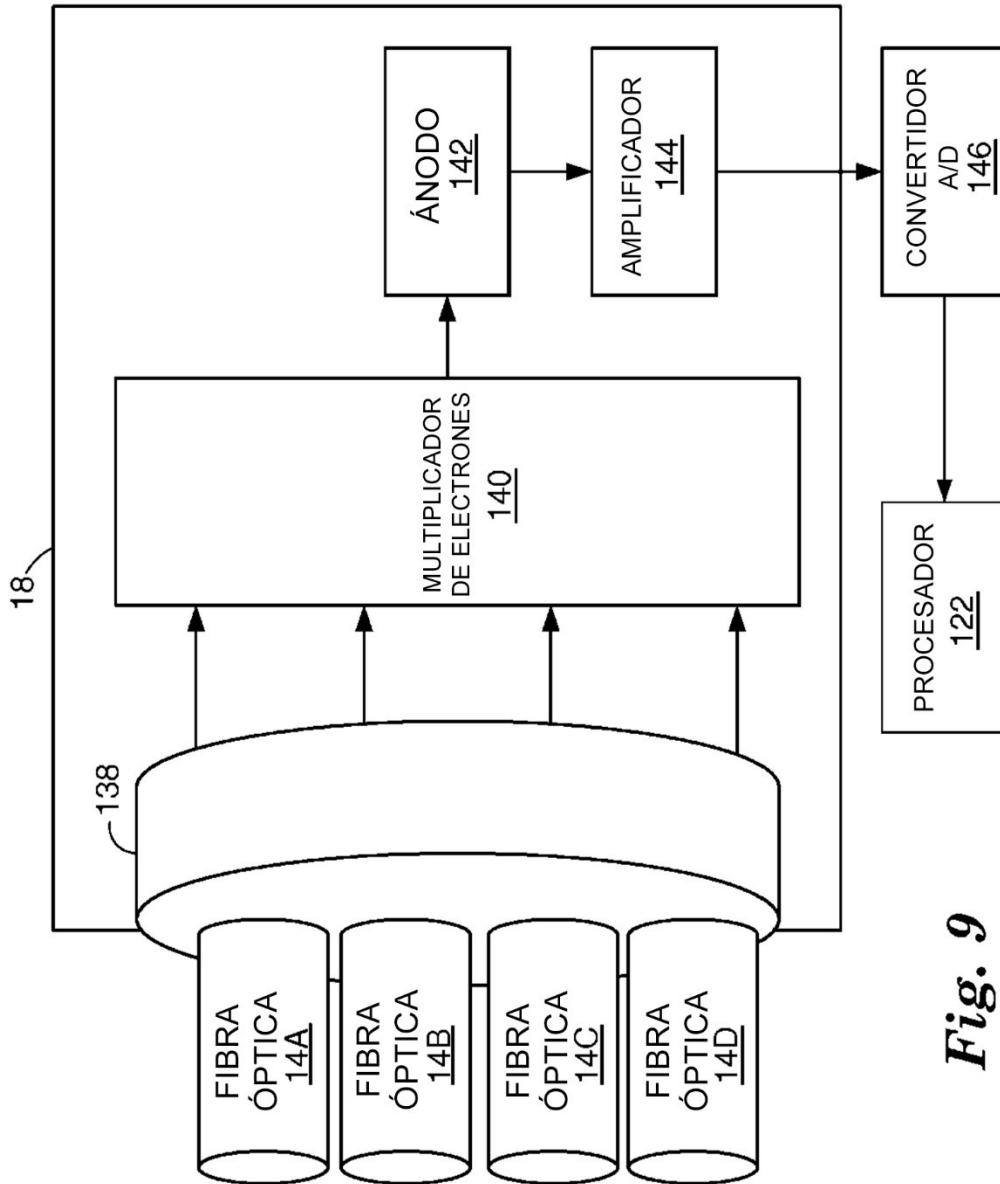


Fig. 9

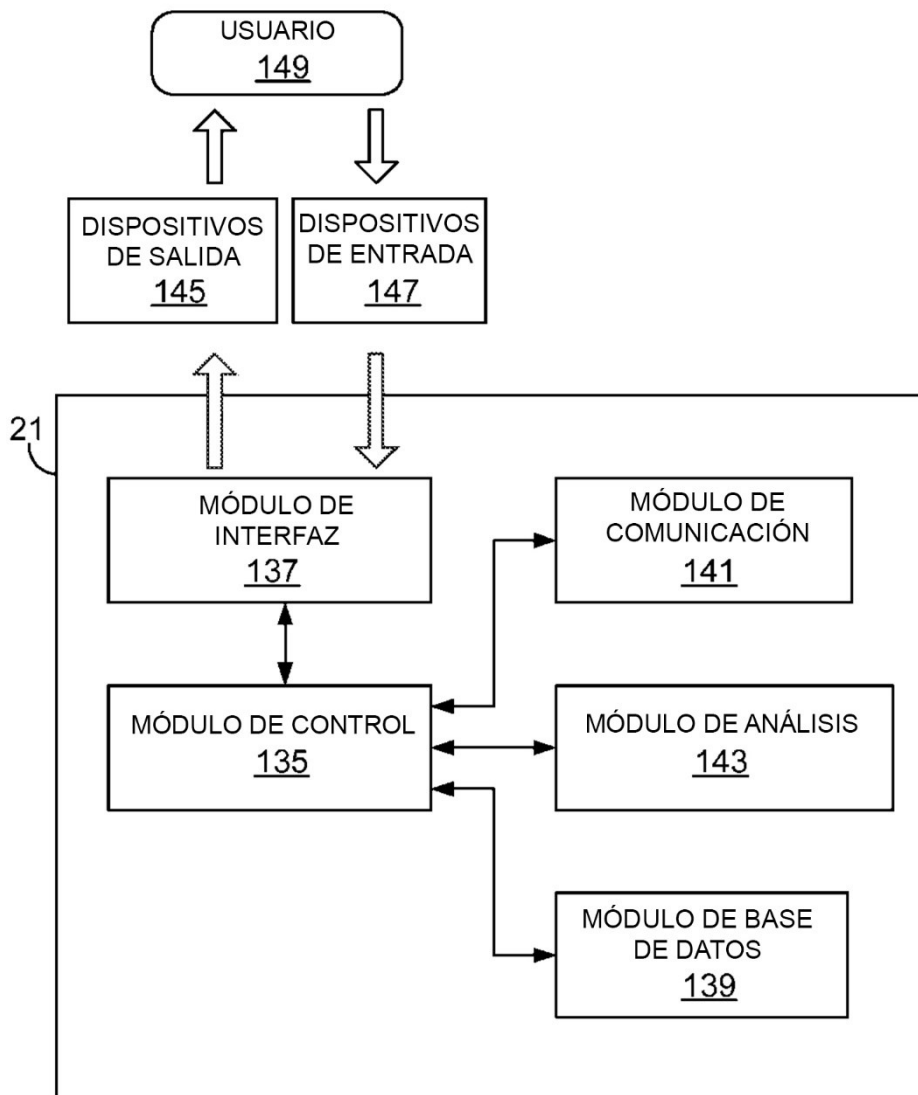


Fig. 10

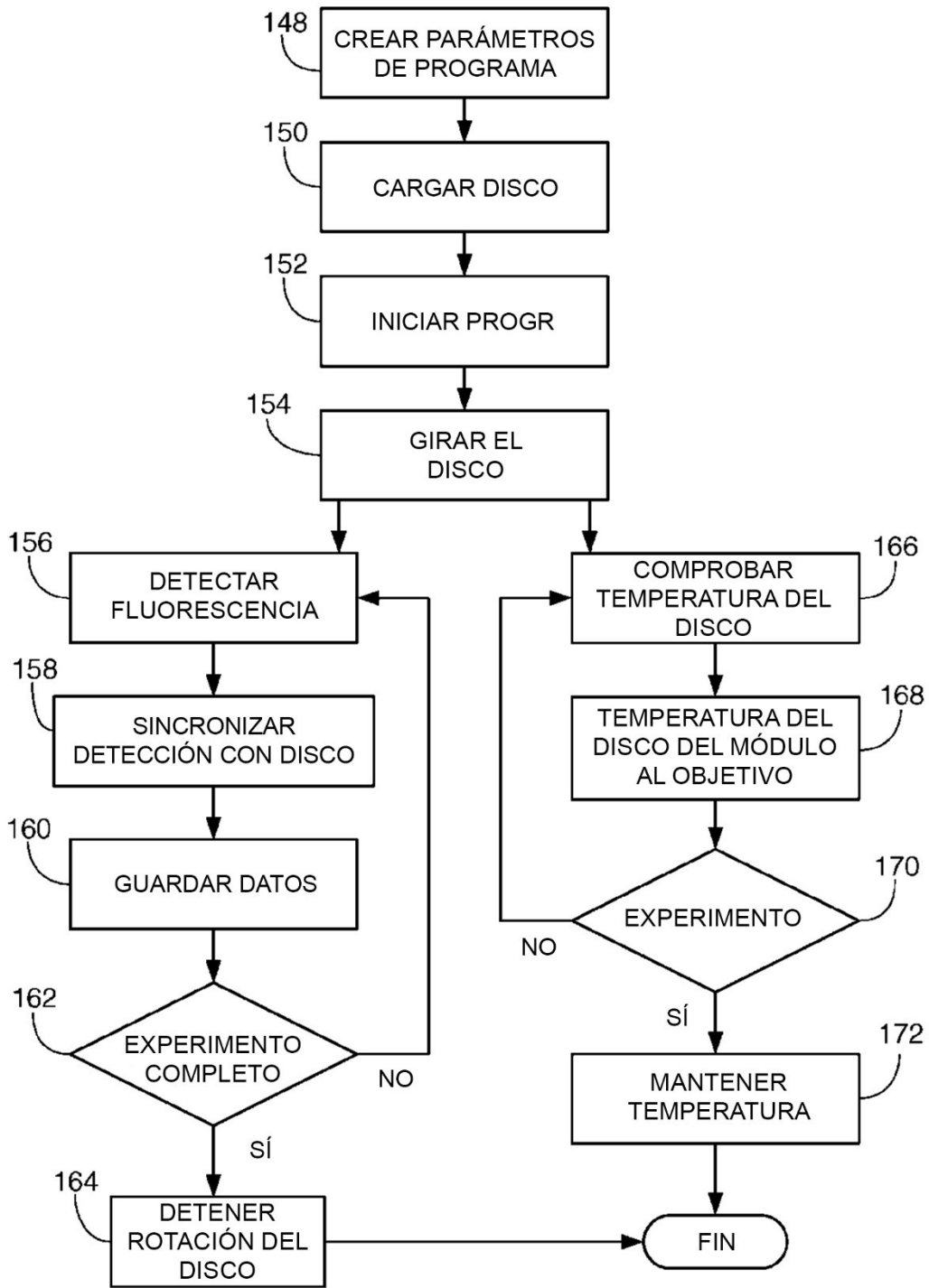


Fig. 11

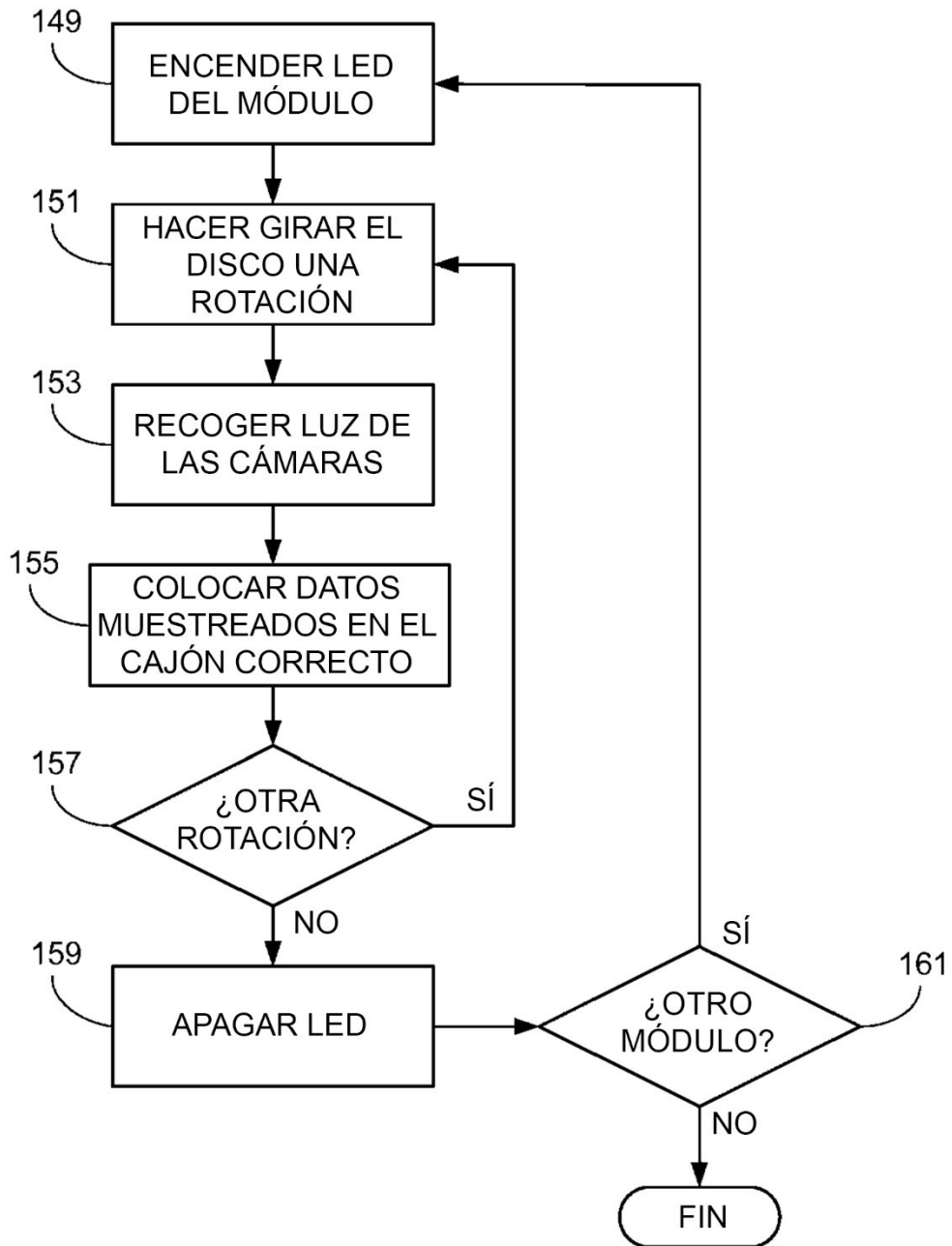


Fig. 12

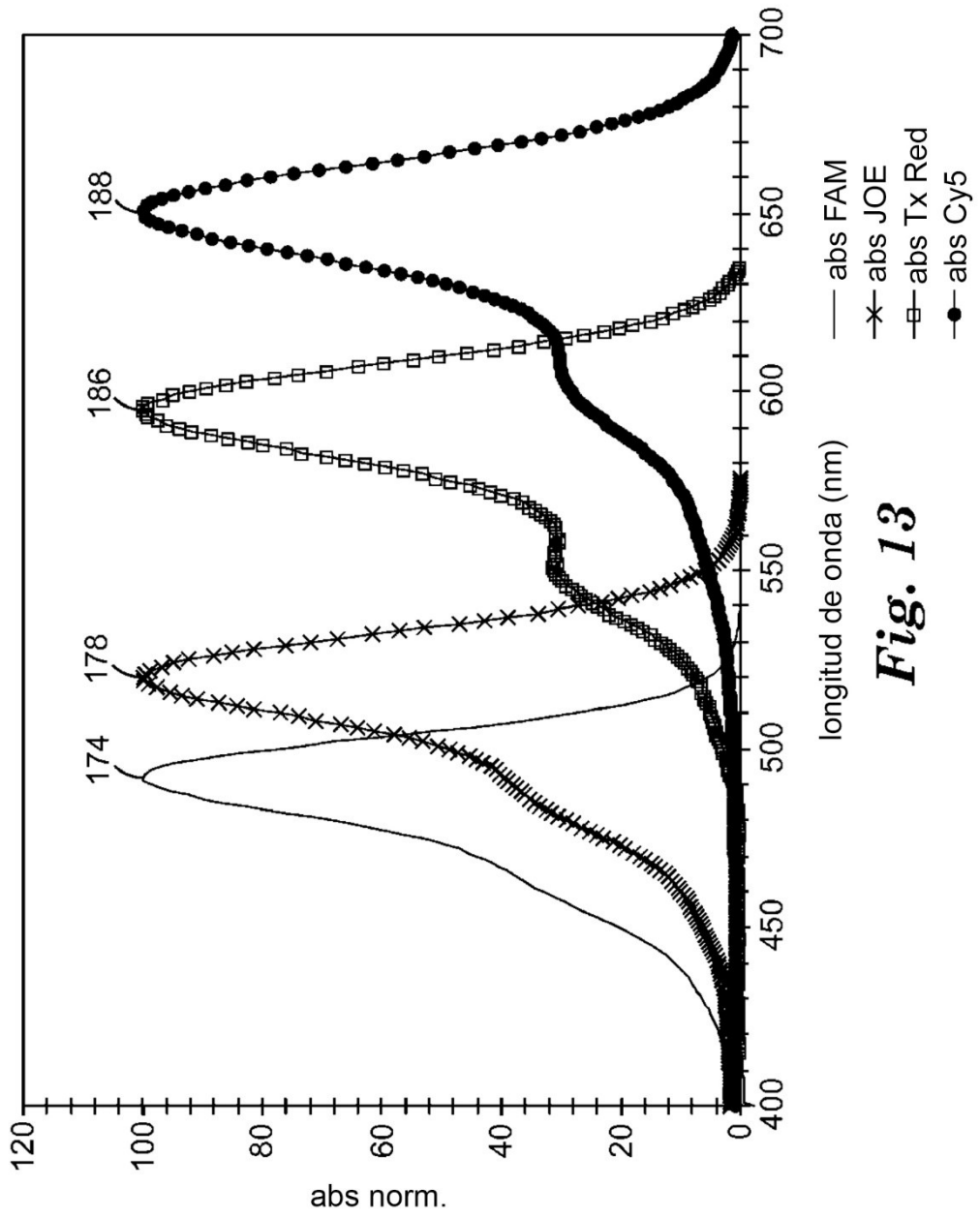


Fig. 13

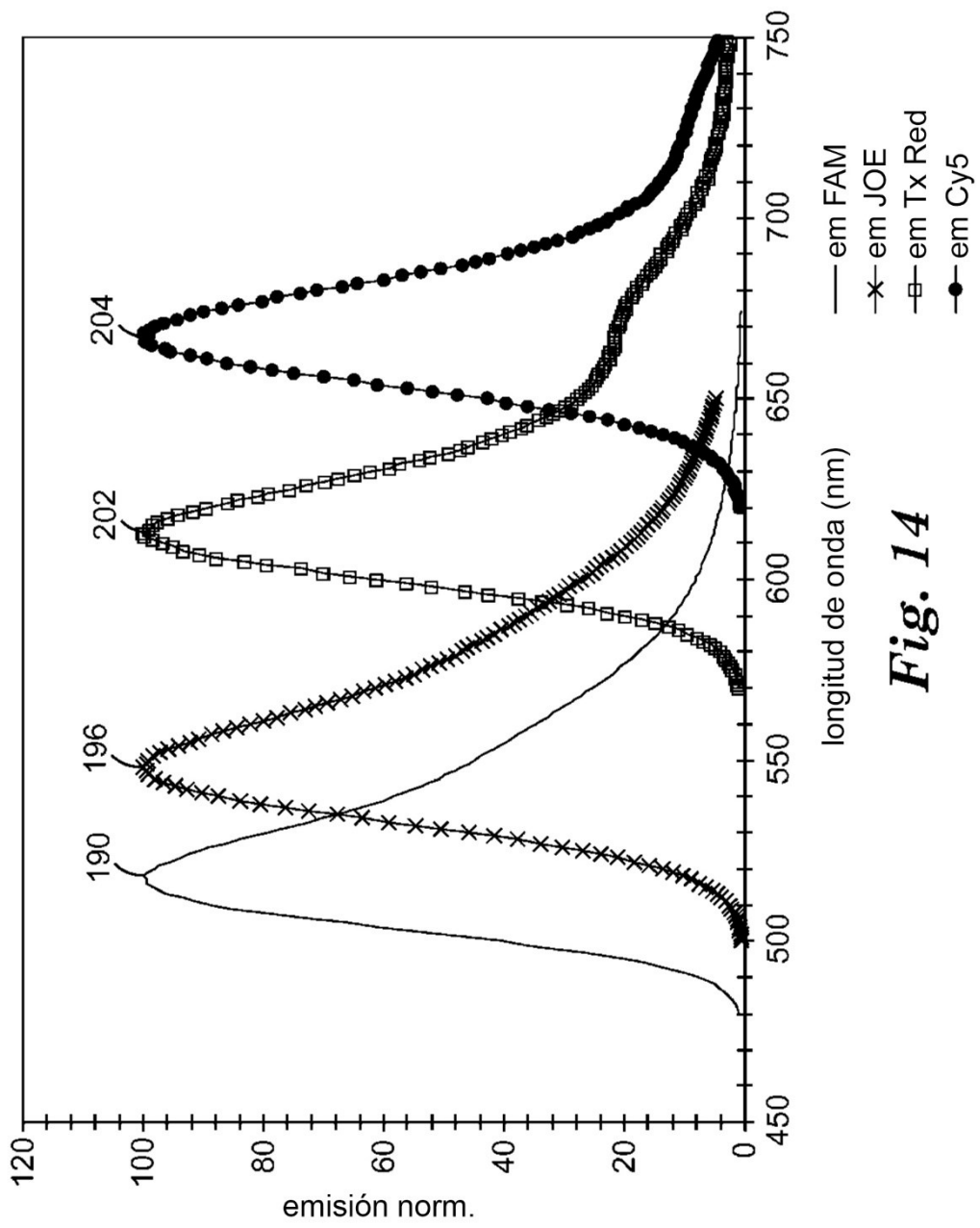


Fig. 14

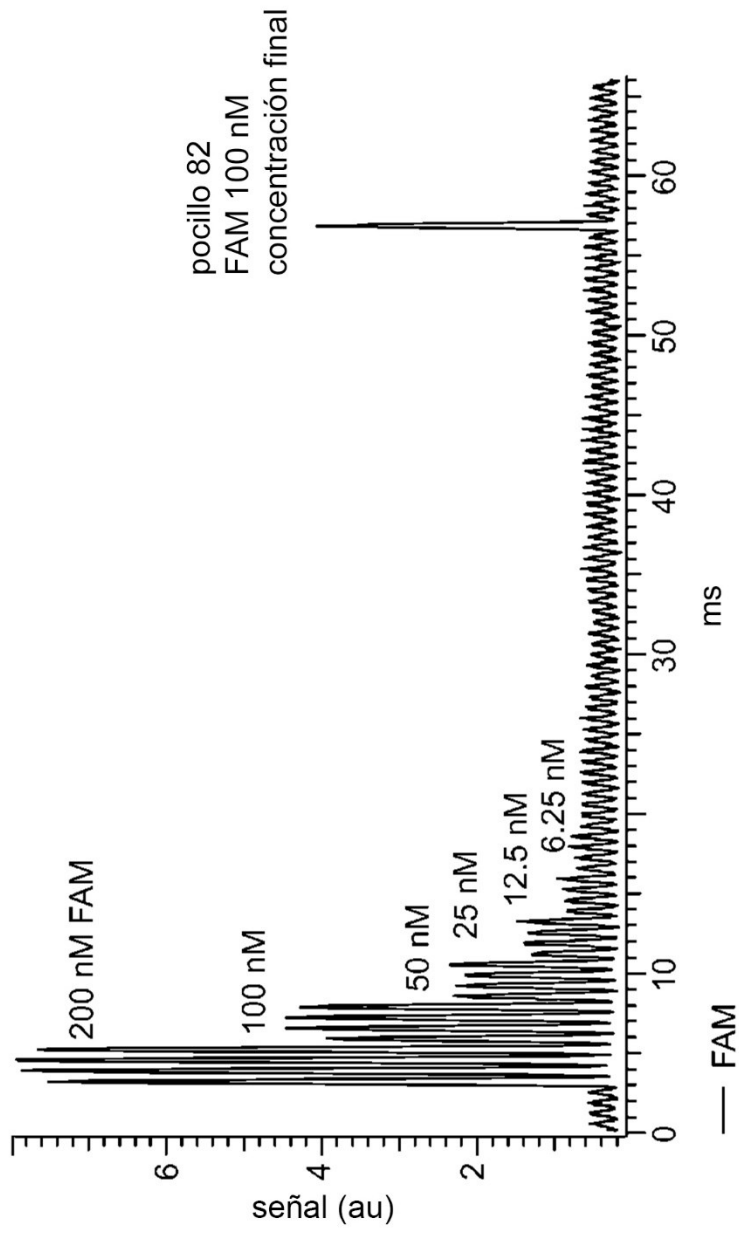


Fig. 15A

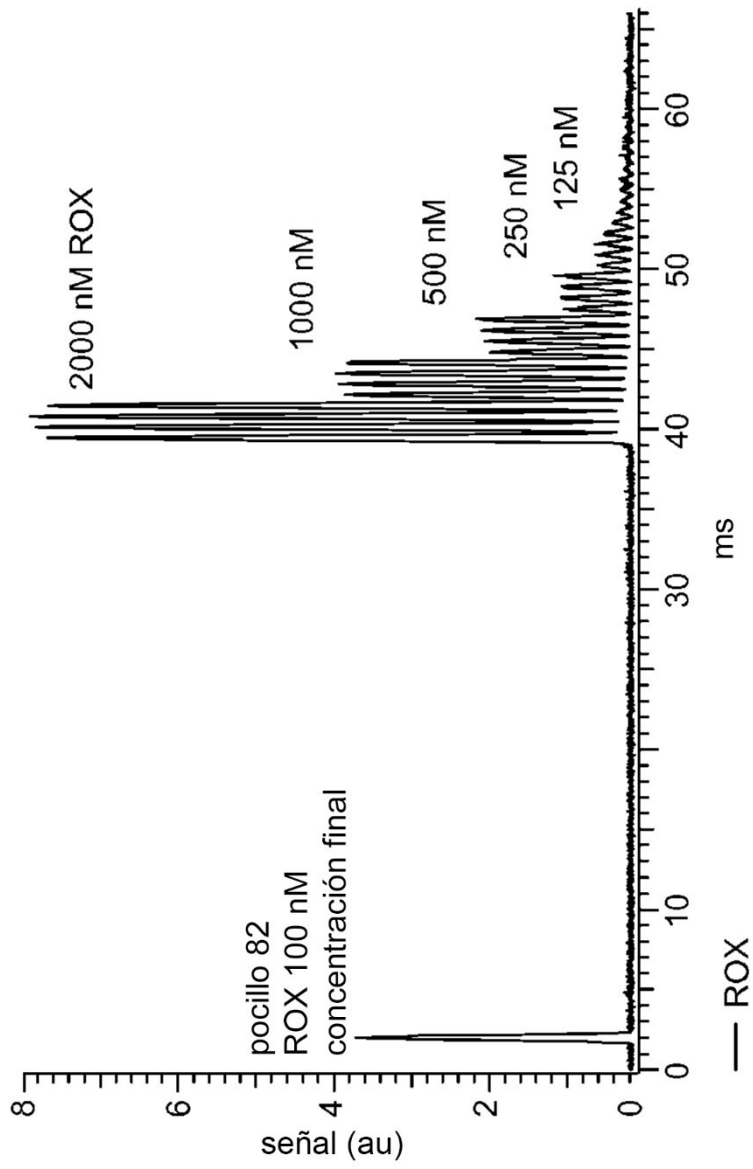


Fig. 15B

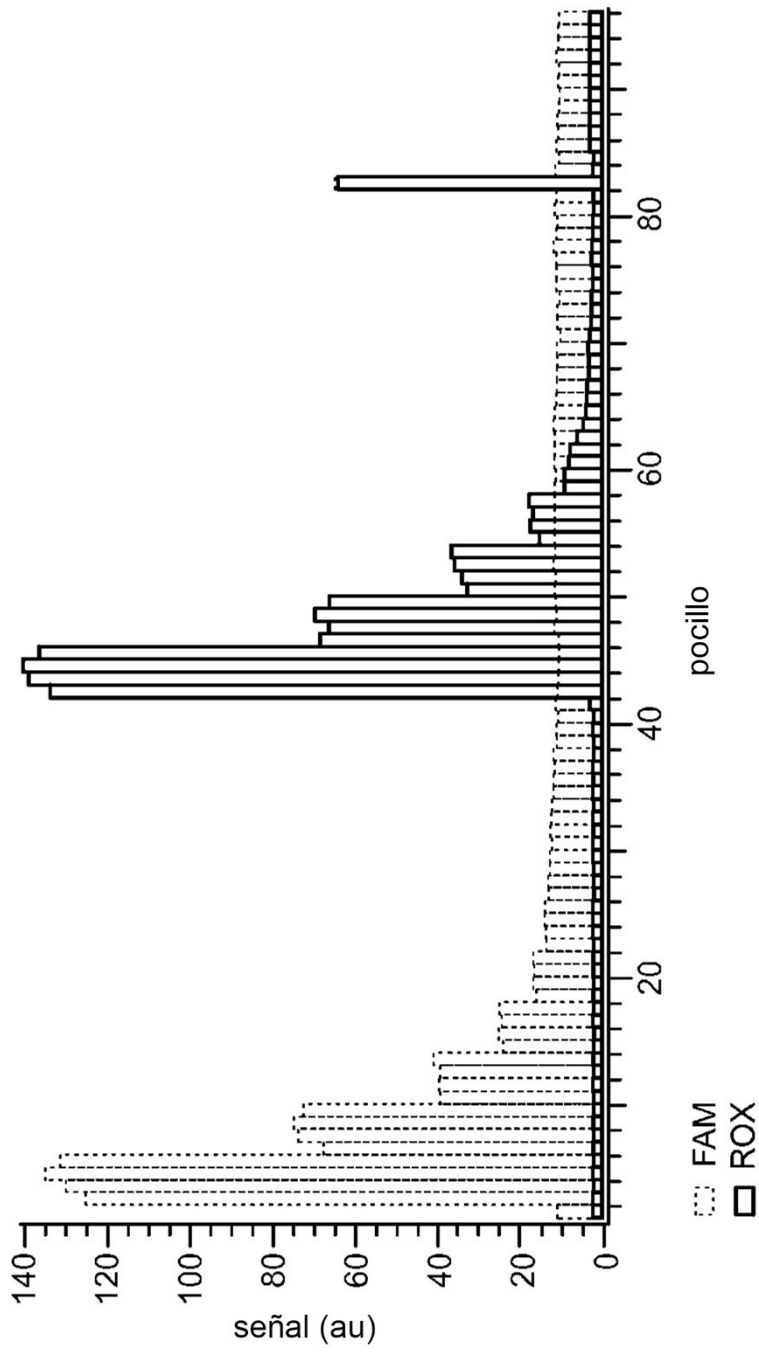


Fig. 16

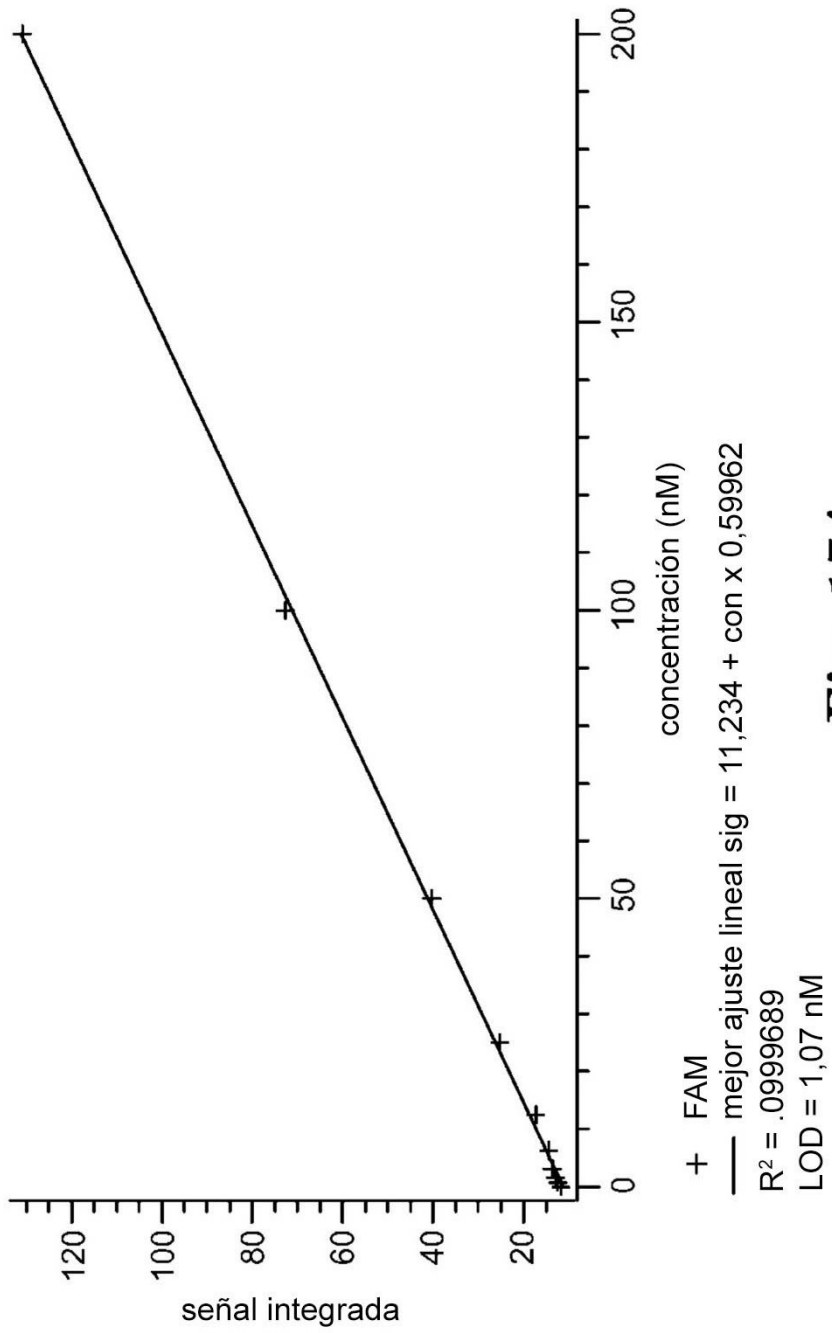


Fig. 17A

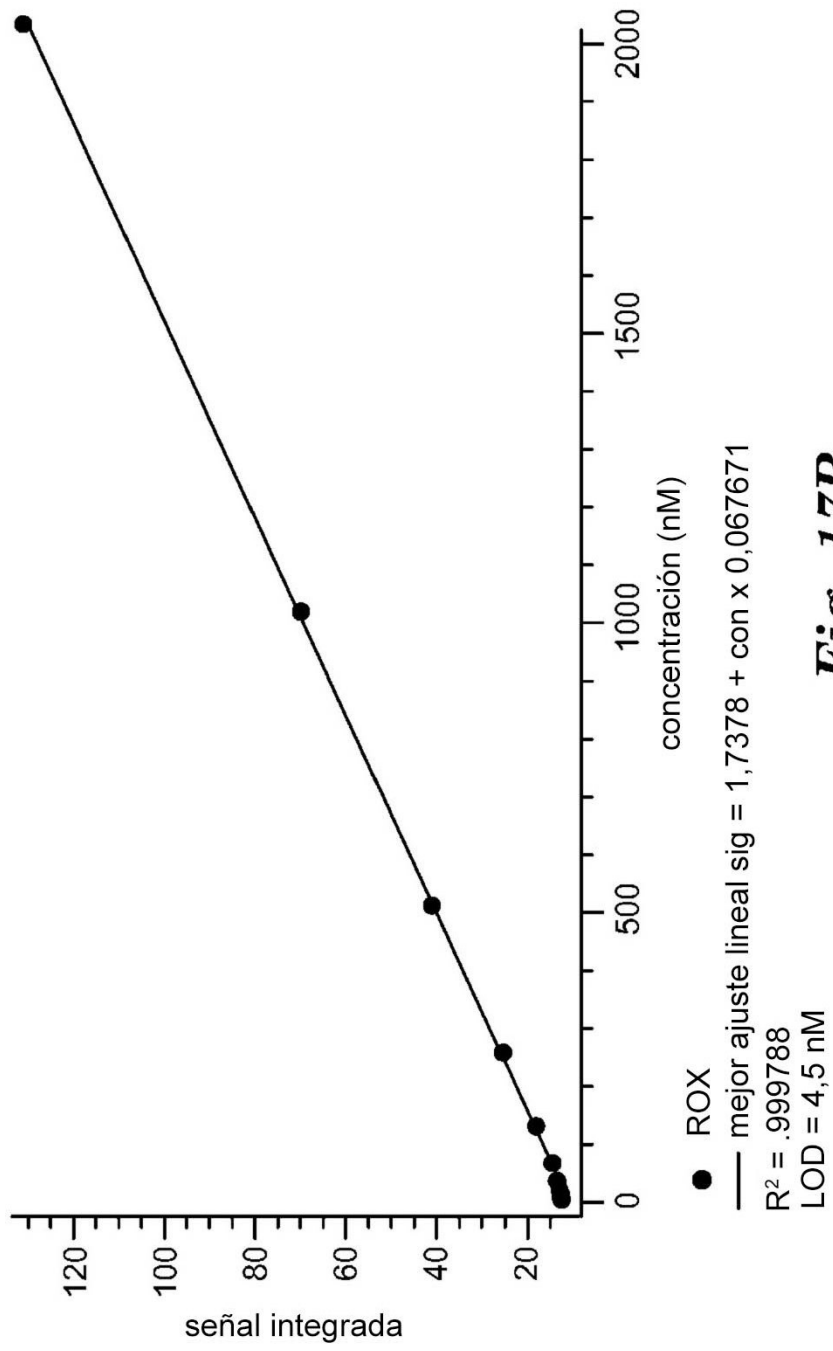


Fig. 17B



Fig. 18

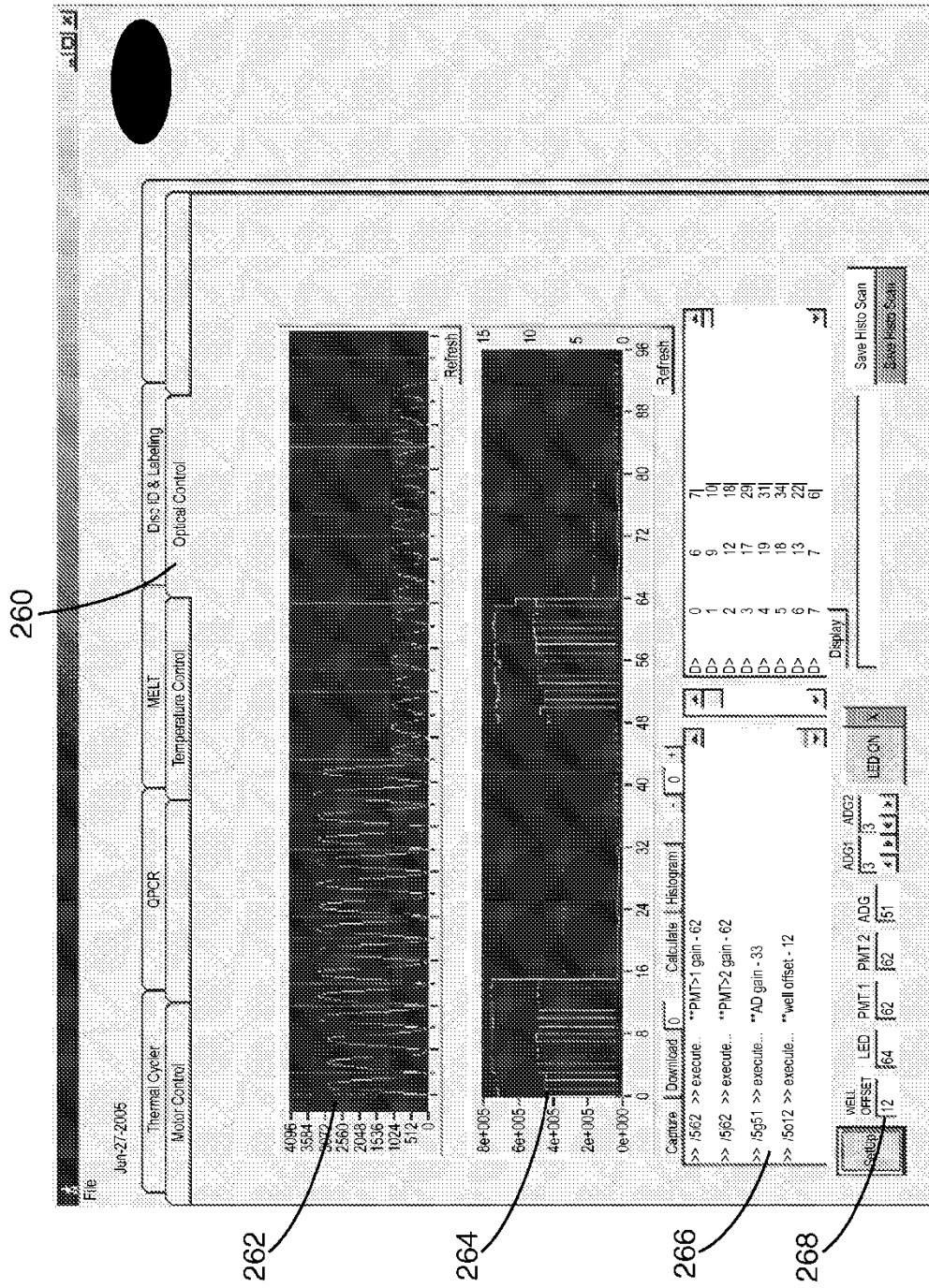


Fig. 19

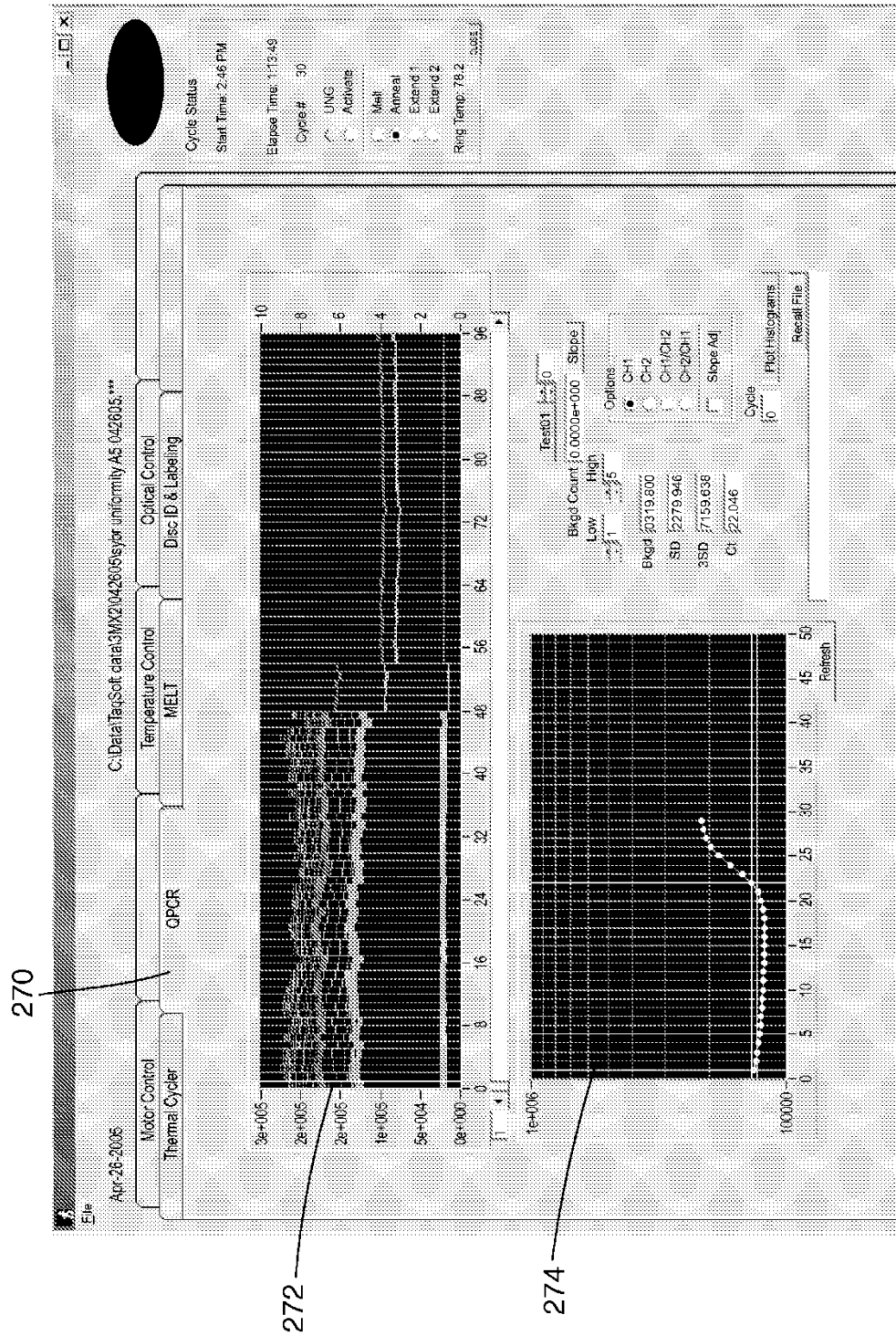


Fig. 20

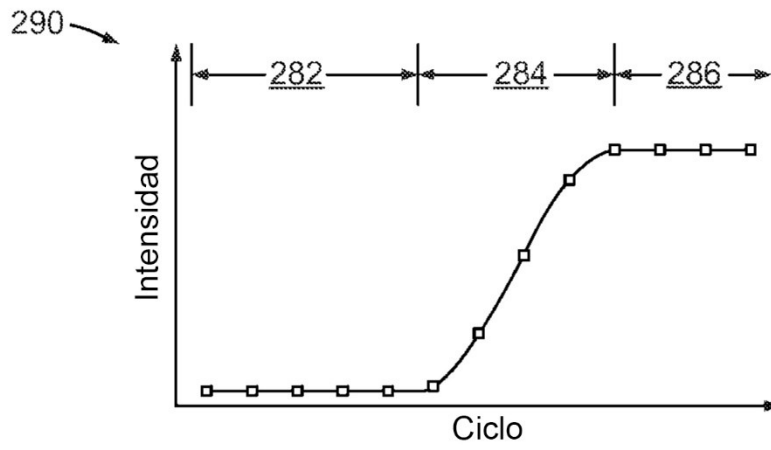


Fig. 21

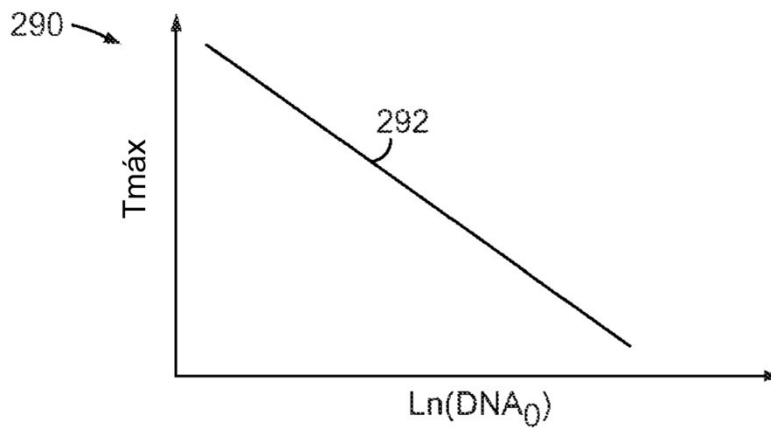


Fig. 22

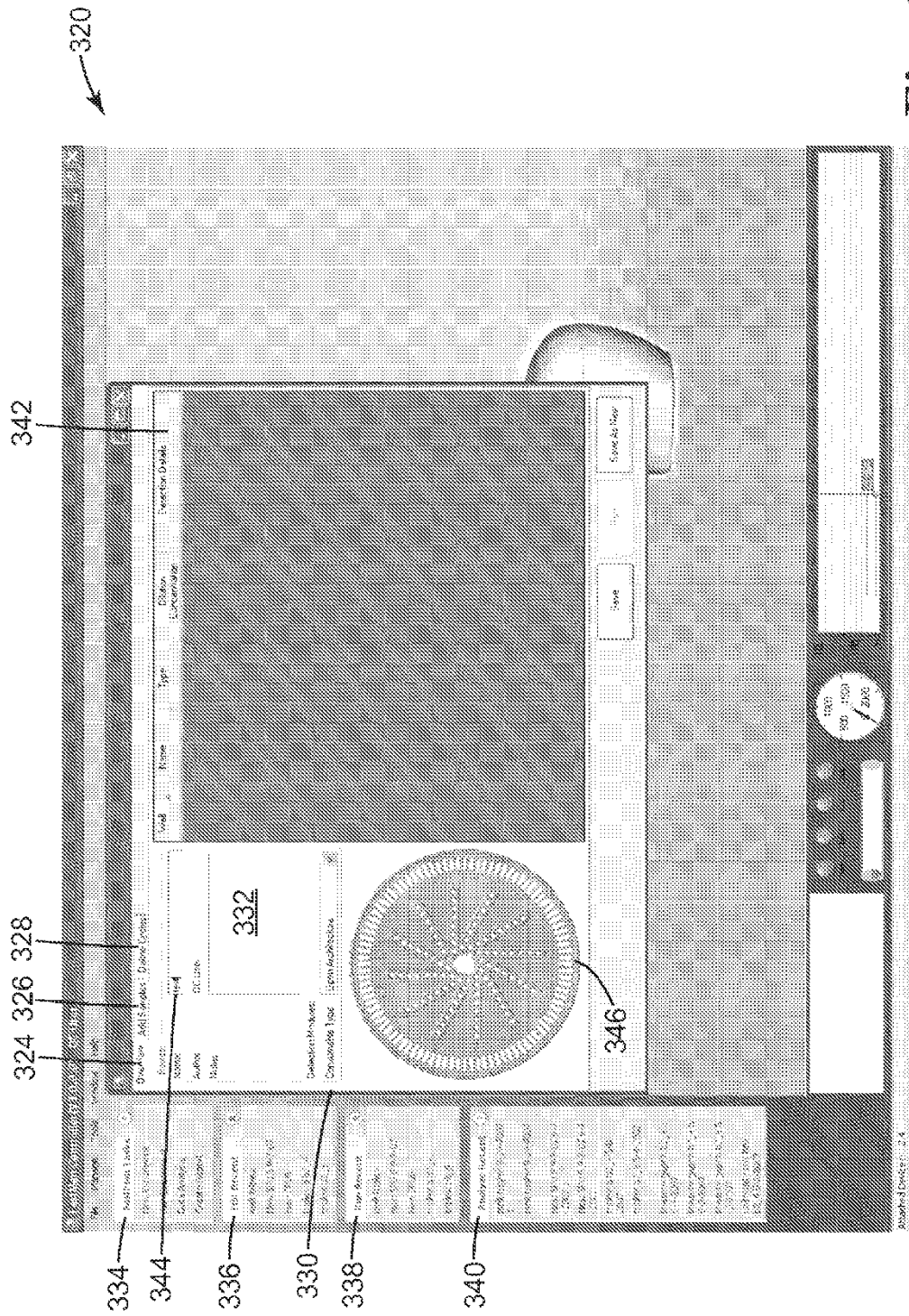


Fig. 23

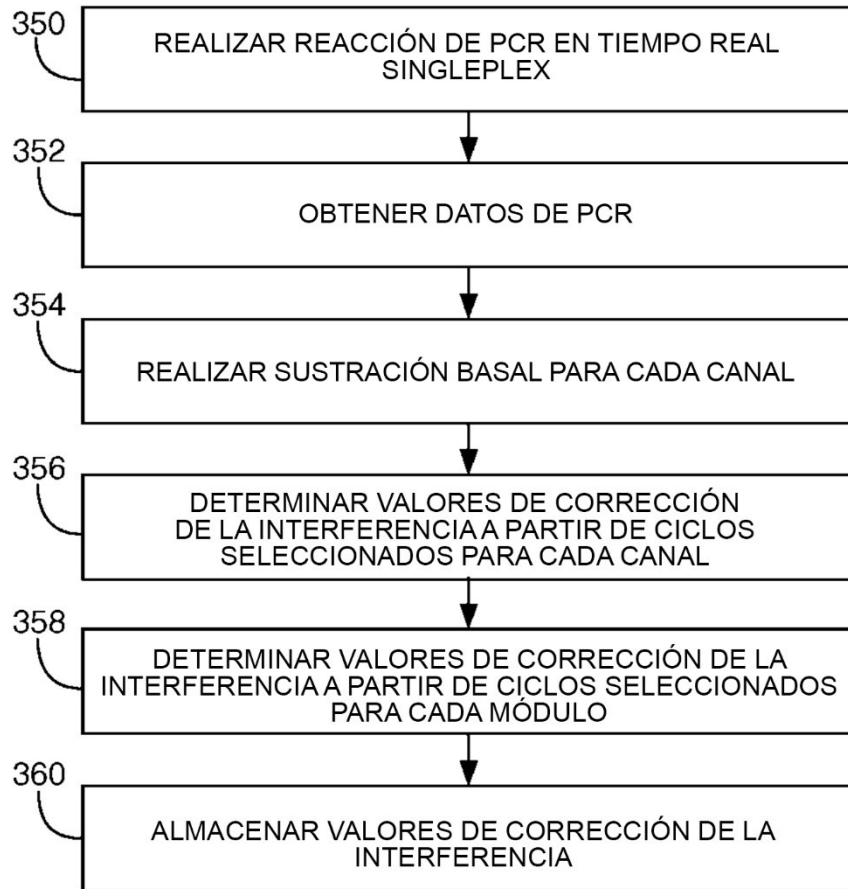


Fig. 24

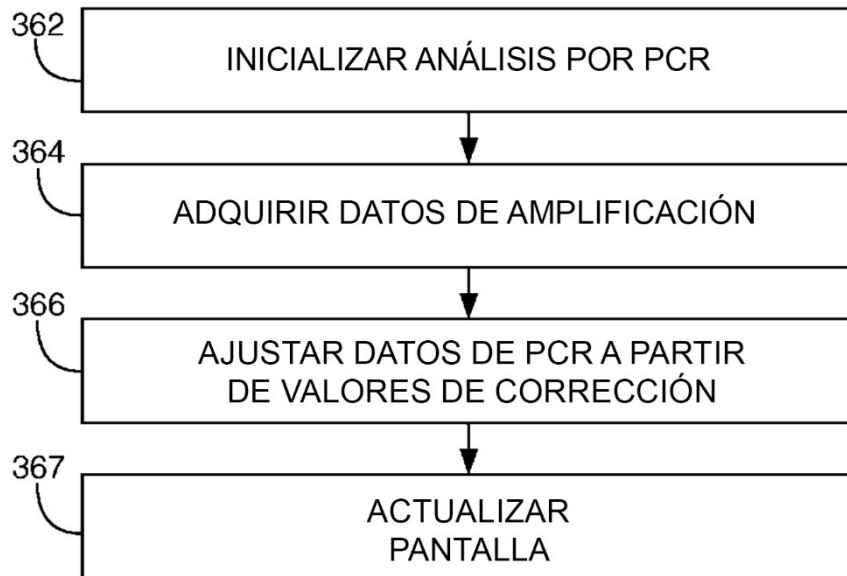


Fig. 25

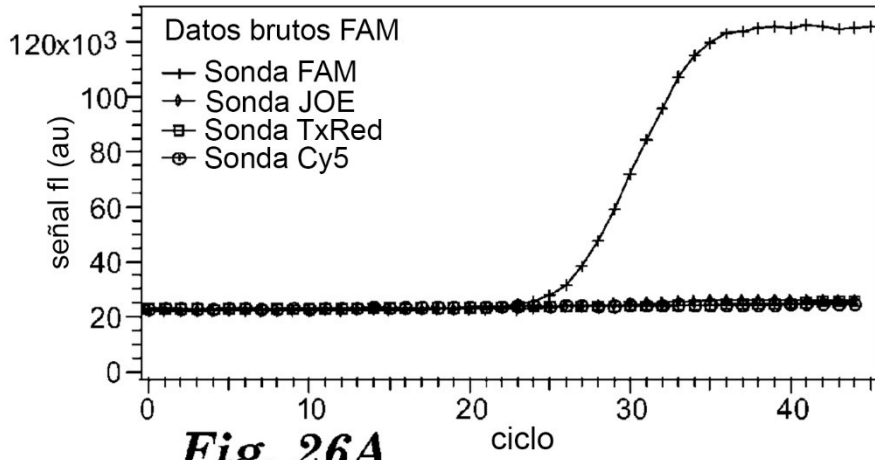


Fig. 26A

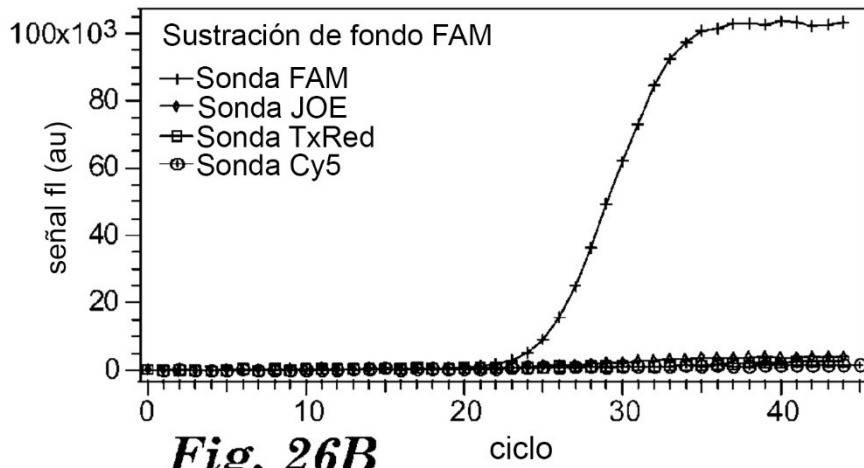


Fig. 26B

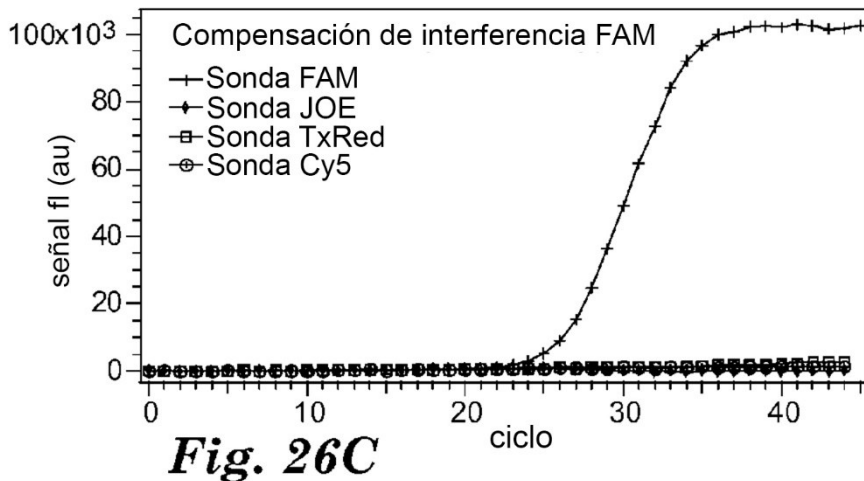


Fig. 26C

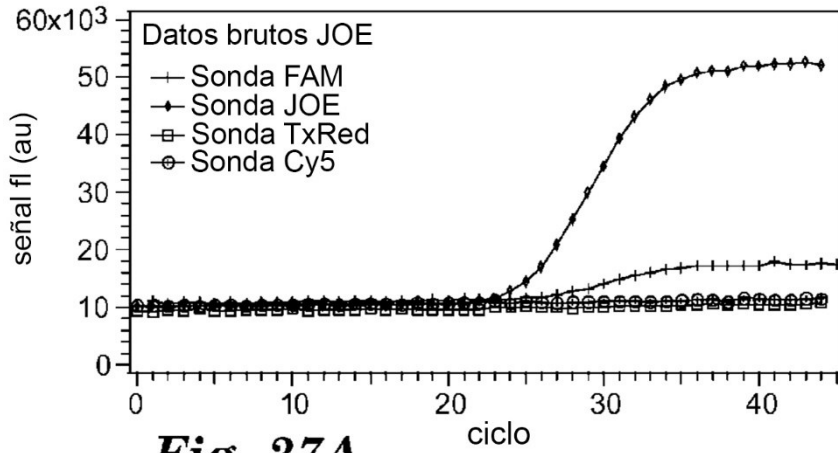


Fig. 27A

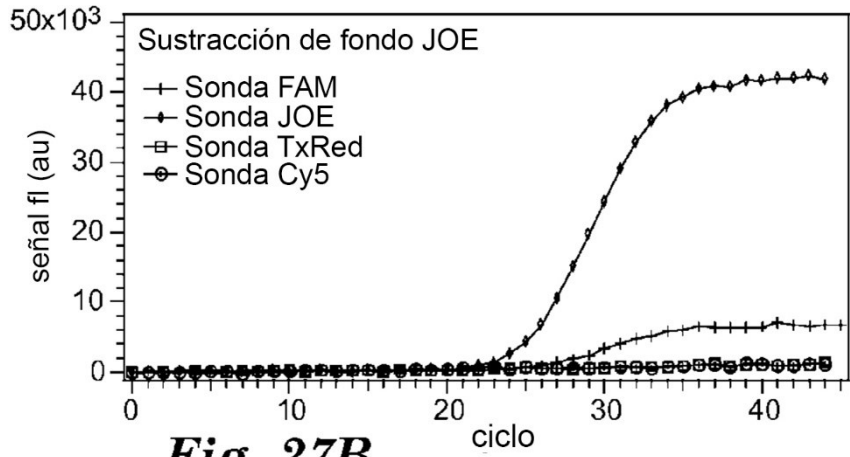


Fig. 27B

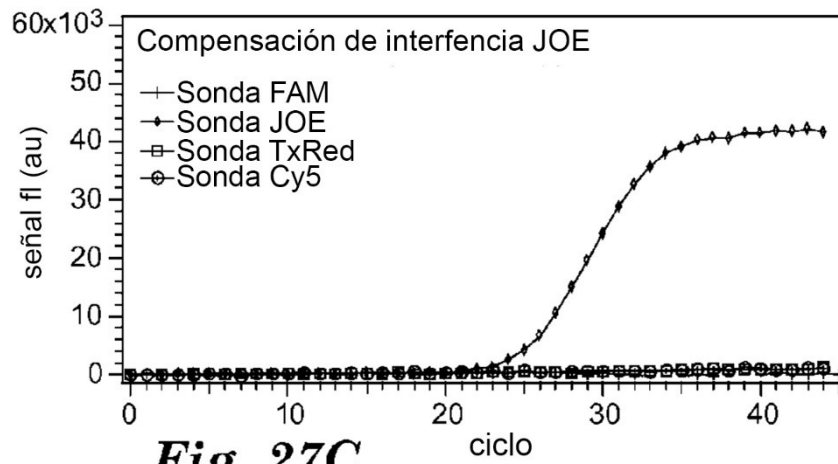
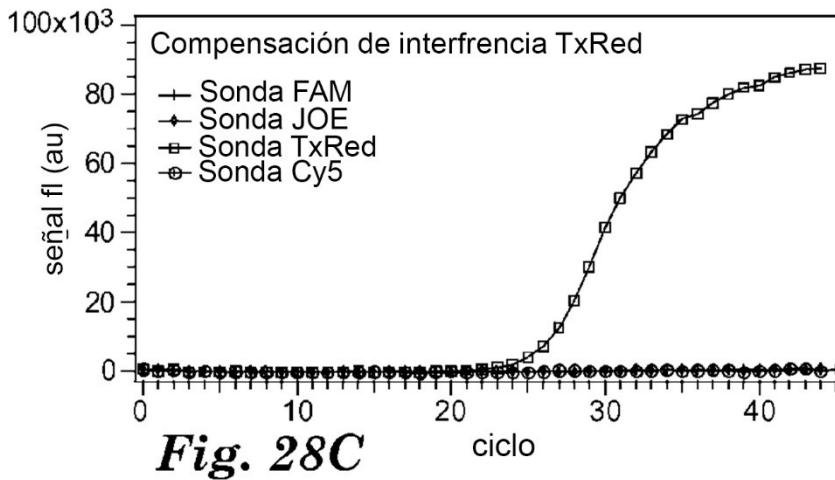
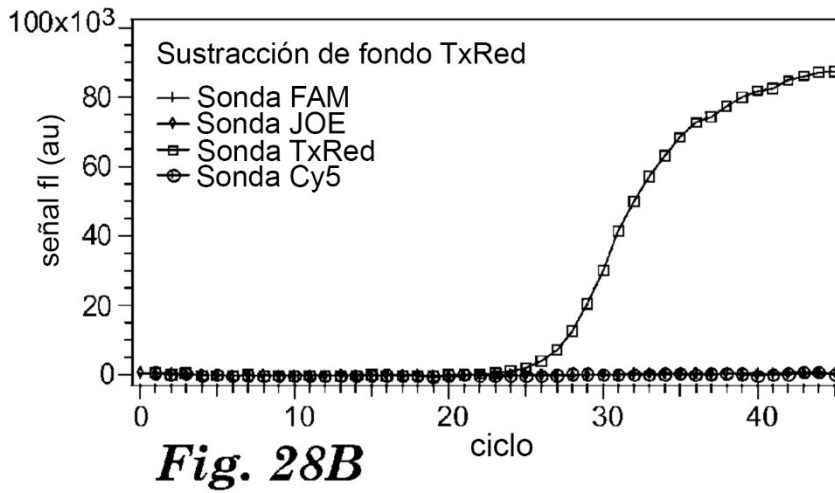
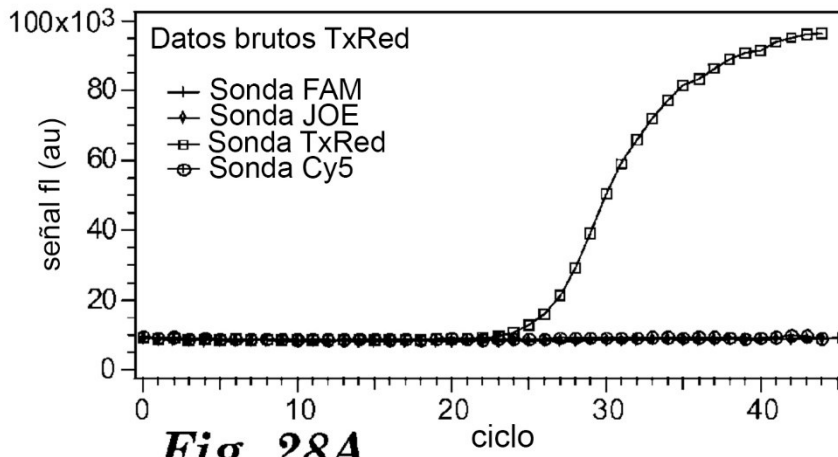


Fig. 27C



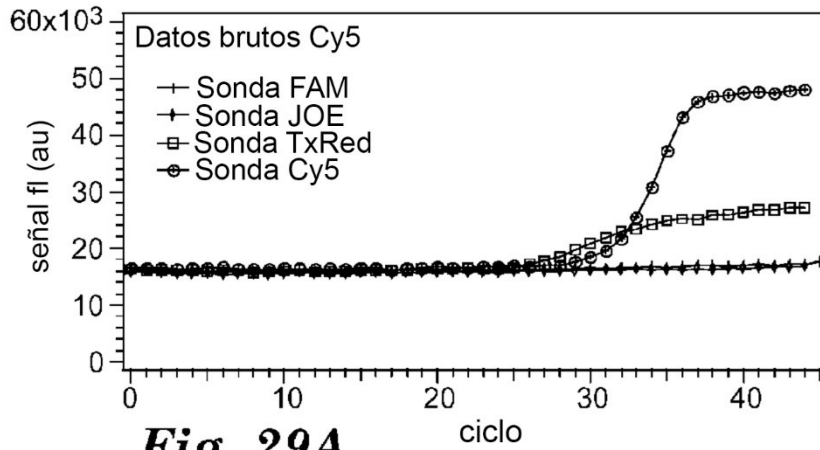


Fig. 29A

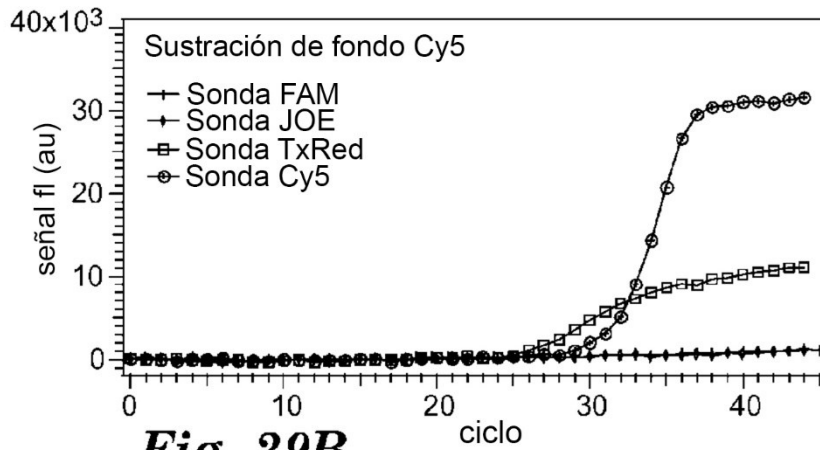


Fig. 29B

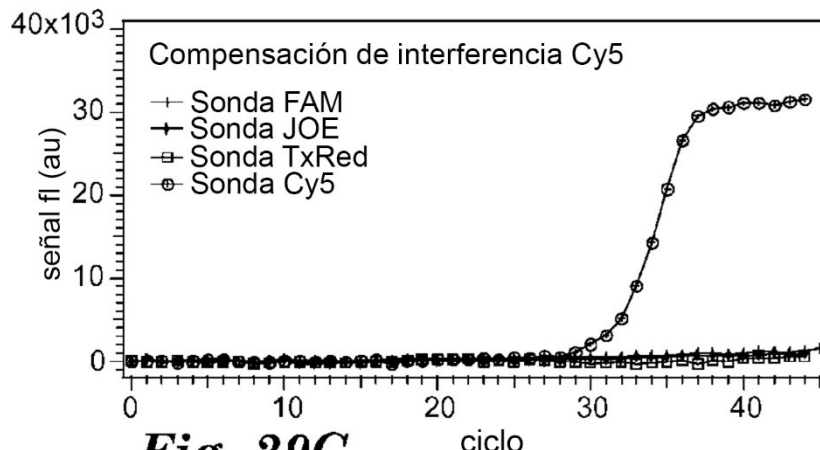
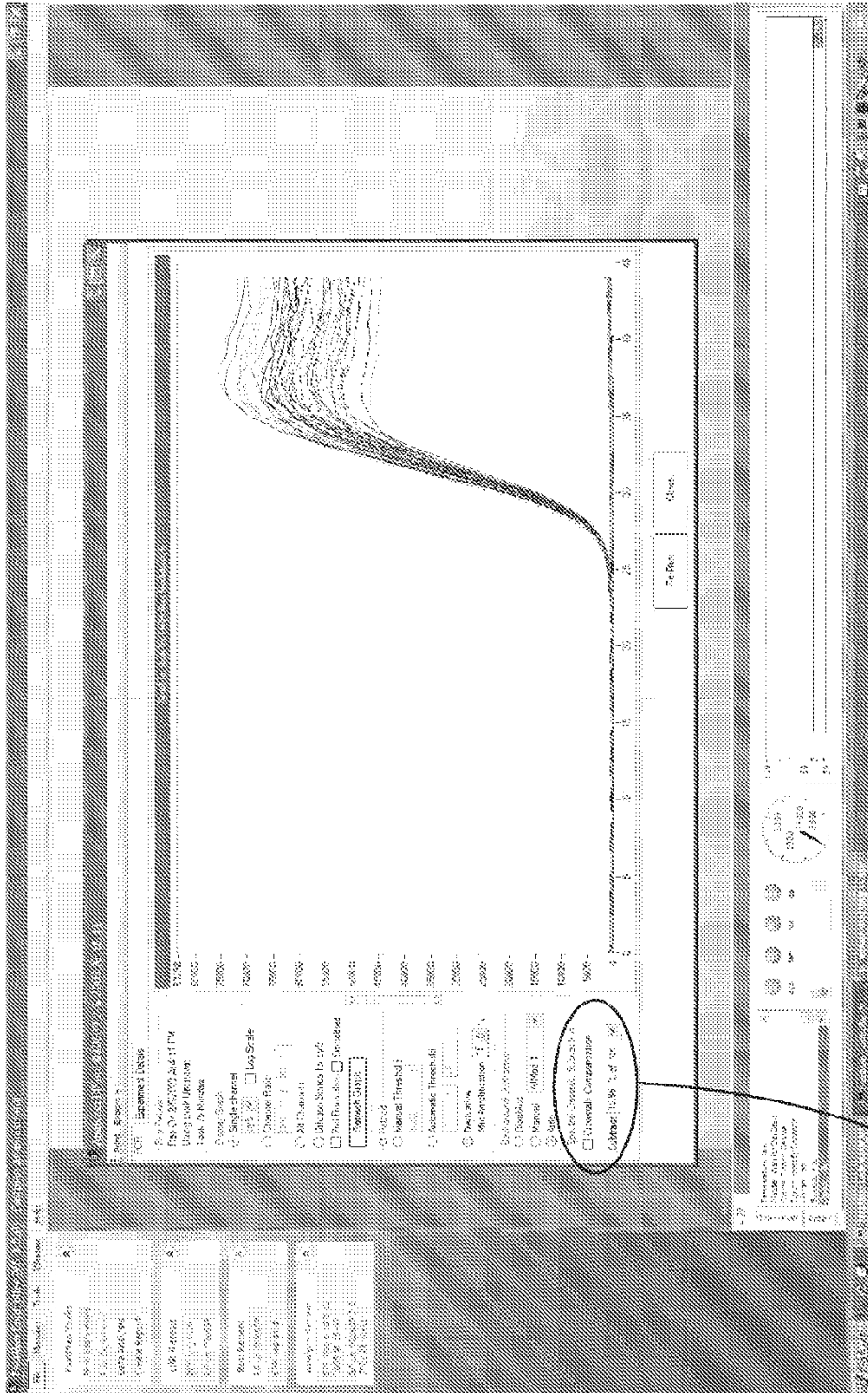


Fig. 29C



370

Fig. 30