

5 SISTEMA PORTÁTIL ISOTERMAL PARA MEDIR FLUORESCENCIA TRAVÉS DE IMÁGENES

Campo de la invención

10 La presente invención pertenece al campo de los instrumentos de medición. Particularmente a los instrumentos de medición por fluorescencia con calentamiento isotermal.

Estado de la técnica

15 En el estado de la técnica se encontró la patente US2014335527 que provee “Sistemas y métodos para dispositivo móvil de análisis de ácidos nucleicos y proteínas”. La misma explica un sistema portátil para extraer, opcionalmente amplificar y detectar ácidos nucleicos, ácidos o proteínas usando un chip integrado compacto en combinación con un sistema de dispositivo móvil para analizar señales detectadas y comparar y distribuir los
20 resultados a través de una red inalámbrica. Sistemas y métodos relacionados están provistos.

A diferencia de la solución encontrada, la invención que se provee permite el análisis por medio de imágenes lo que facilita el análisis simultáneo de más de una muestra. Esta ventaja es fundamental frente a la invención encontrada que sólo permite el análisis de una
25 muestra cada vez. Adicionalmente, las fuentes de luz de la invención provista pueden ser cambiadas según el rango espectral de absorbancia de la muestra, lo que amplía la cantidad de tipos de muestras que se pueden analizar.

5 Breve descripción de la invención

El sistema propuesto, comprende un gabinete portátil, dividido en tres zonas o recámaras, conectado a un computador u otro dispositivo con un procesador de datos, donde cada zona o recámara comprende una serie de dispositivos o componentes que en su conjunto permiten la cuantificación de la fluorescencia del material analizado. Se puede conectar a la corriente o trabajar con batería. Asimismo, comprende una tapa frontal, que en la modalidad provista de la solución, está unida al borde inferior del gabinete por intermedio de un sistema de bisagras y que permite acceder al gabinete para ajustar los componentes, dar mantenimiento al sistema e introducir o extraer una estructura de pozos. Todo el dispositivo es activado y controlado desde el computador o dispositivo con procesador de datos. El procesamiento de las imágenes obtenidas también se realiza desde el dispositivo por medio del mismo software que controla y activa el sistema.

Breve descripción de las figuras

20

Figura 1. Muestra una vista frontal con la puerta abierta, donde se observan las tres recámaras y los componentes que cada una contiene.

25 Descripción detallada de la invención

La realización de pruebas PCR requiere de un termociclador para poder amplificar las muestras de ácido nucleico, ello imposibilita o dificulta en extremo que estos tests se puedan realizar *in situ* o en zonas rurales o incomunicadas. Por otra parte, ciertas pruebas portátiles como las LAMP que se basan en colorimetría, no son capaces de detectar muestras con baja carga. De manera que existe un problema técnico irresoluto debido a la imposibilidad de realizar pruebas portátiles capaces de trabajar con muestras con baja carga (bajas concentraciones de ácido nucleico).

5 El sistema propuesto, comprende un gabinete portátil (1), dividido en tres zonas o
recámaras (2) (3) (4), conectado a un computador u otro dispositivo con un procesador de
datos, donde cada zona o recámara comprende una serie de dispositivos o componentes
que en su conjunto permiten la cuantificación de la fluorescencia del material analizado. Se
puede conectar a la corriente o trabajar con batería. Asimismo, comprende una tapa frontal,
10 que en la modalidad provista de la solución, está unida al borde inferior del gabinete por
intermedio de un sistema de bisagras y que permite acceder al gabinete para ajustar los
componentes, dar mantenimiento al sistema e introducir o extraer una estructura de pozos.
Todo el dispositivo es activado y controlado desde el computador o dispositivo 5 con
procesador de datos. El procesamiento de las imágenes obtenidas también se realiza desde
15 el dispositivo por medio del mismo software que controla y activa el sistema.

Ello resuelve el problema técnico planteado al permitir la amplificación de las muestras en
campo sin un termociclador.

La solución técnica de la presente solicitud se describirá en detalle a continuación en
combinación con realizaciones específicas. Sin embargo, debe entenderse que los
20 elementos, estructuras y características en una realización también pueden incorporarse
ventajosamente en otras realizaciones sin descripción adicional.

Así, es posible reordenar los componentes mencionados sin que se afecte el principio de
funcionamiento y configurarlos bajo otra forma. Por ello, la configuración comprende ciertas
25 secuencias o estructuras lógicas (e.g. emisión de luz – cristal separador – compartimento
oscuro) que no son modificables; y otras, como la ubicación de esos componentes en una
u otra recámara, o el orden de las zonas dentro de la recámara, que pueden alterarse y
obtener el mismo resultado.

30 En la descripción de la presente solicitud, el orden de mención de los componentes se utiliza
únicamente con fines descriptivos, y no puede entenderse que indique o implique la
importancia relativa de los mismos, o que indiquen implícitamente el número de
características técnicas indicadas. La relación de orientación o posición indicada por los
términos "superior", "intermedia", "inferior", etc. se basa en la relación de orientación o
35 posición mostrada en las figuras aportadas.

- 5 En una primera recámara (2) (superior) se encuentra ubicado un sensor de carga acoplada (15) (CCD) que recibe la luz de excitación previamente filtrada por medio de un filtro de fluorescencia (6) ubicado frente a éste y que le permite medir la fluorescencia de las imágenes adquiridas. El ancho de onda de la luz de excitación puede modificarse en dependencia de fluoróforo usado.
- 10 En este caso la excitación se realizará, opcionalmente, en ángulo de 0° —dispersión trasera— respecto de la fuente de iluminación y el detector— al igual que la medición de las imágenes—, por intermedio de dos fuentes de luz (7) que pueden ser láser o de diodo de alta potencia — mínimo 1 watt— ubicadas en ambos laterales del sensor de carga acoplada (15) respectivamente. Ambas fuentes de luz estarán separadas del sensor CCD
- 15 (15) que se mantiene aislado de estas fuentes de luz (7) por sendos tabiques (8), que en la modalidad provista de la invención son de plástico. Las fuentes de luz (7) pueden ser cambiadas según el rango espectral de absorbancia de la muestra, lo que amplía la cantidad de tipos de muestras que se pueden analizar.

La ventaja de usar láser o un diodo en la excitación, además de la potencia, es el ancho de

20 banda de emisión de la luz, esto hace que el filtro trabaje con mayor eficiencia debido a que no hay luz remanente en la región transmitida por el filtro (6).

Una segunda recámara (3) (intermedia) que consiste en un compartimento oscuro y herméticamente aislado del primer compartimento por medio de un cristal separador (9) transparente que impide la transferencia de temperatura de esta segunda cámara (3) a la

25 primera (2). Esto con el objetivo de impedir que el calor generado en el compartimento oscuro empañe el lente del sensor (15) ubicado en la recámara anterior (2) y afecte la medición efectuada por el mismo.

Esta segunda recámara (3), contiene además, una resistencia (10) para el calentamiento del compartimento, de tal forma que la reacción de amplificación del ácido nucleico ocurra

30 a una temperatura constante. También comprende una estructura o plato de pozos (11) con entre 1 y 8 pozos, ubicada en el piso de la recámara, donde se deposita la mezcla maestra (mezcla de los reactivos con las muestras de ácido nucleico). La estructura de pozos (11) debe estar ubicada a una distancia del sensor de carga que permita la visualización idónea del plato.

35 También en la recámara intermedia (3) se dispone un termómetro (12) que se usa para medir en tiempo real la temperatura de la recámara (3) y que se conecta a un controlador

5 de temperatura (13) que controla el voltaje de la resistencia, regulando así la dispersión de calor para la mantención de la temperatura constante en el habitáculo.

Finalmente, la recámara intermedia tiene también un ventilador (14) cuya función es hacer convección del calor generado por la resistencia en toda la recámara.

El sistema comprende también una recámara (inferior) (4) ubicada en la base que contiene el controlador de temperatura (13), que en una modalidad preferida de la invención es PID (proporcional, integral, derivado) al que se conectan el ventilador (14).

El sistema adquiere imágenes con el tiempo a una temperatura isotermal. En las imágenes aparecerán áreas oscuras y áreas iluminadas. Las áreas iluminadas son representativas de los pozos, mientras que las áreas oscuras representan las porciones de imagen donde no hay muestra de la mezcla.

La imagen es analizada a través de un software que la subdivide por pozos, de manera que cada subdivisión representa un pozo .

A partir de la imagen obtenida para cada pozo se calculará la suma de las intensidades de los píxeles para cada subdivisión. Posteriormente, se realiza la resta de las intensidades de los píxeles para cada subdivisión en tiempo con la medida a tiempo cero (medida relativa). Esta señal normalizada se graficará con el tiempo y luego se establece un umbral que permitirá precisar si la amplificación es positiva o negativa.

Ejemplo

En un ejemplo de utilización de la invención, se coloca la mezcla en la estructura de pozos (11) y se introduce en la recámara intermedia (3). Una vez cerrada la tapa frontal (5), se enciende el sistema por medio de un computador. El sistema es operado de manera automática por el software. Asimismo, durante el proceso de amplificación de la muestra, el controlador de temperatura (13) mantiene estable la temperatura en la recámara intermedia (3) y para ello controla la resistencia (10), el ventilador (14) y el termómetro (12) simultáneamente. Una vez obtenidas las imágenes por el sensor de carga acoplada (15) (CCD), éstas son procesadas por el software de procesamiento de imágenes que determina si se produce amplificación de las muestras.