

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 841**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2018** **PCT/US2018/016180**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2018** **WO18144567**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2018** **E 18747994 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2023** **EP 3577440**

54 Título: **Sistema y método con fiduciales en organizaciones no rectilíneas**

30 Prioridad:

01.02.2017 GB 201701688

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.04.2024

73 Titular/es:

ILLUMINA, INC. (100.0%)
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, US

72 Inventor/es:

VIECELI, JOHN S.;
NEMIROSKI, ALEX;
BELITZ, PAUL;
LANGLOIS, ROBERT;
BOWEN, M. SHANE;
CHAN, DANNY YUAN;
VENKATESAN, BALA MURALI K.;
HAN, HUI;
SAMIEE, KEVAN y
TANNER, STEPHEN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 966 841 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

Sistema y método con fiduciales en organizaciones no rectilíneas

5 La presente solicitud se refiere a un sistema y método con fiduciales en organizaciones no rectilíneas.

Antecedentes

10 Se ha desarrollado un número creciente de aplicaciones para matrices con patrón. Tales matrices con patrón pueden, por ejemplo, soportar sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y de ácido ribonucleico (ARN). Estas son específicas de secuencias de nucleótidos presentes en genes en seres humanos y otros organismos. En algunas aplicaciones, por ejemplo, las sondas de ADN y ARN individuales se pueden unir en ubicaciones pequeñas en una retícula geométrica (o aleatoriamente) sobre un soporte de matriz con patrón. Una muestra de prueba, tal como de una persona u organismo conocido o desconocido, puede exponerse a la retícula, de tal manera que los genes complementarios de fragmentos hibridan con sondas en los sitios individuales en la matriz. La matriz puede examinarse entonces, tal como escaneando frecuencias específicas de luz sobre los sitios para identificar qué genes o fragmentos están presentes en la muestra, frecuentemente por fluorescencia de los sitios en los que se ubican genes o fragmentos. La detección de las características de la matriz a la que están unidos fragmentos de la muestra se puede usar para identificar secuencias moleculares presentes en la muestra. Las matrices de ácido nucleico se pueden usar también para la secuenciación genética básica. En general, la secuenciación genética consiste en determinar el ácido nucleico o el orden de nucleótidos en una longitud de material genético. La tecnología continúa evolucionando y mejorando, y se están secuenciando en matrices muestras de ácido nucleico cada vez más grandes, tal como genomas más complejos (así como otros analitos).

25 Para estas y otras aplicaciones de matrices de ácido nucleico, se han realizado mejoras también en el hardware y la programación de detección. Por ejemplo, las mejoras en los sistemas de imagenología permiten un escaneo y obtención de imágenes más rápidos, más precisos y de mayor resolución, tal como mediante el uso de escaneo lineal y control confocal de la óptica de imagenología. Sin embargo, en un ejemplo, a medida que aumenta la densidad de características en las matrices, y disminuye el tamaño de las características y se expande el tamaño global de las matrices, la detección precisa se vuelve problemática. Con el aumento del número y la densidad de sitios en las matrices, los desafíos incluyen la capacidad de ubicar con precisión los sitios, alinear o indexar los sitios en ciclos sucesivos de secuenciación y obtención de imágenes, y evitar problemas que puedan confundir la comparación de imágenes sucesivas o datos de imagen (necesarios para determinar las secuencias presentes en los sitios de la matriz). Los costes económicos y el tiempo involucrados en la detección y el procesamiento de imágenes también pueden resultar problemáticos.

40 El documento WO2008/096318 A2 describe un sistema que comprende una matriz de biosensores bidimensional que tiene una pluralidad de puntos formados sobre un sustrato, y una fuente de luz para iluminar la matriz de biosensores, en donde un detector de múltiples píxeles, tal como un CCD, detecta un patrón de fluorescencia que se origina a partir de los puntos. En un ejemplo, una pluralidad de puntos de referencia codificados o puntos de calibración que portan etiquetas de fluoróforo se colocan en ubicaciones predefinidas sobre una retícula bidimensional y se usan para la identificación o calibración de dicha matriz de biosensores bidimensional.

Resumen

45 Un primer aspecto de la presente descripción proporciona un sistema de análisis configurado para realizar ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes como se define en la reivindicación 1.

50 En un ejemplo del primer aspecto, la organización no rectilínea comprende posiciones de características fiduciales que están a diferentes distancias X de un primer borde del soporte y a diferentes distancias Y de un segundo borde ortogonal del soporte. Como ejemplo, la organización no rectilínea comprende una organización hexagonal.

55 En un ejemplo del primer aspecto, la configuración no rectilínea comprende una organización de no repetición a lo largo del soporte.

En un ejemplo del primer aspecto, los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes se realizan utilizando luz a diferentes longitudes de onda. Como ejemplo, los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes se realizan utilizando luz a al menos dos longitudes de onda diferentes, y en donde el material fluorescente de las características fiduciales es sensible a ambas de las al menos dos longitudes de onda diferentes.

60 En un ejemplo del primer aspecto, las características fiduciales comprenden al menos una depresión y objetos dispuestos en la al menos una depresión, comprendiendo los objetos el material fluorescente. Como un ejemplo, los objetos dispuestos en la al menos una depresión son demasiado grandes para alojarse en las ubicaciones del soporte que alojan las muestras biológicas.

65 En un ejemplo del primer aspecto, las ubicaciones están dispuestas en un patrón de repetición regular sobre el soporte.

En un ejemplo del primer aspecto, el soporte comprende una pluralidad de áreas de las ubicaciones, y en donde se proporciona una pluralidad de las características fiduciales en cada una de la pluralidad de áreas.

5 En un ejemplo del primer aspecto, las características fiduciales comprenden formas adyacentes pero no concéntricas.

En un ejemplo del primer aspecto, las características fiduciales comprenden una forma no cerrada.

10 En un ejemplo del primer aspecto, las características fiduciales están estructuradas para producir información de codificación de datos de imagen.

15 Un ejemplo del primer aspecto comprende además al menos una característica fiducial adicional que está formada en o sobre el soporte y es ópticamente reflectante para, durante la obtención de imágenes, devolver al menos una parte de la radiación incidente para localizar, ajustar la ubicación de, o poner en correspondencia exacta el soporte o las ubicaciones.

Un segundo aspecto de esta descripción proporciona un método para analizar muestras biológicas usando ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes según la reivindicación 10.

20 Un ejemplo del segundo aspecto comprende además obtener imágenes de las muestras biológicas y las características fiduciales en los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes a diferentes longitudes de onda de luz para producir datos de imagen que codifican señales fluorescentes producidas por las muestras biológicas y las características fiduciales.

25 Un ejemplo del segundo aspecto comprende además acceder a datos de imagen que codifican imágenes sucesivas de muestras biológicas dispuestas en ubicaciones sobre un soporte, siendo diferentes las muestras biológicas entre sí para responder de manera diferente en ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes, codificando además los datos de imagen imágenes de características fiduciales en el soporte que tiene material fluorescente que responde en los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes, en donde las características fiduciales
30 están dispuestas sobre el soporte en una disposición no rectilínea; poner en correspondencia exacta, para las imágenes sucesivas, las ubicaciones sobre el soporte mediante referencia a las características fiduciales; y procesar las imágenes sucesivas puestas en correspondencia exacta para transformar datos derivados de las imágenes sucesivas en datos de secuencia.

35 Un ejemplo comprende además caracterizar moléculas que tienen etiquetas en las ubicaciones en cada una de las imágenes sucesivas.

Breve descripción de los dibujos

40 Estas y otras características y aspectos de las presentes técnicas se entenderán mejor cuando se lea la siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos adjuntos en los que caracteres idénticos representan partes idénticas en todos los dibujos, en donde:

45 la figura 1 es una visión general esquemática de una matriz con patrón y sistema de procesamiento, tal como para muestras biológicas, que emplea aspectos de las presentes técnicas;

la figura 2 es una visión general esquemática de los componentes funcionales que pueden incluirse en un sistema de análisis de datos para su uso en un sistema del tipo ilustrado en la figura 1;

50 la figura 3 es una vista en planta de una matriz con patrón biológica de ejemplo del tipo que puede usarse junto con las presentes técnicas;

la figura 4 es una vista recortada ampliada de una parte de la matriz con patrón de la figura 3;

55 la figura 5 es un diagrama recortado adicional que ilustra sitios en una matriz de ejemplo;

la figura 6 es una vista ampliada de dos sitios de ejemplo que ilustran la pixelación en datos de imagen para los sitios durante el procesamiento;

60 la figura 7 es una representación esquemática recortada de una parte de ejemplo de una matriz con patrón y un fiducial de ejemplo formado en una región de sitio y fuera de la región de sitio;

las figuras 8A-8C son vistas en sección parcial, recortadas, de una parte de la matriz de la figura 7 que ilustra perlas u otras estructuras depositadas en la matriz para formar la característica fiducial;

65

la figura 9 es una visión general simplificada de una matriz con patrón que ilustra un número de regiones de sitio y fiduciales formados en las regiones de sitio en un patrón definido;

5 la figura 10 es una vista esquemática de una matriz con patrón de ejemplo que tiene fiduciales organizados en un patrón regular;

la figura 11 es una representación esquemática adicional de una matriz con patrón de ejemplo que tiene fiduciales dispuestos en una organización no regular;

10 las figuras 12A-12G son representaciones esquemáticas de organizaciones de ejemplo de fiduciales que permiten una ubicación y un procesamiento mejorados;

la figura 13 es una vista detallada de un fiducial de ejemplo que tiene una forma o configuración no cerrada;

15 la figura 14 es una vista detallada adicional de un fiducial de ejemplo que tiene una forma no cerrada para mejorar la fabricación y el procesamiento de una matriz con patrón;

la figura 15 es una vista detallada adicional de un fiducial de ejemplo que tiene una serie de formas no cerradas;

20 la figura 16 es una vista detallada de un fiducial de ejemplo que tiene una forma no cerrada formada por estructuras de tipo punto;

la figura 17 es una vista detallada adicional de un fiducial de ejemplo que tiene una forma no cerrada y que forma segmentos que pueden transmitir datos, tal como una codificación de tipo código de barras;

25 la figura 18 es una vista detallada de un fiducial de ejemplo que tiene dos formas no cerradas que no son concéntricas;

las figuras 19A-19D son vistas detalladas de fiduciales de ejemplo que comprenden dos formas que no son concéntricas y codifican información, tal como mediante un desplazamiento direccional;

30 la figura 20A es una vista detallada de un fiducial de ejemplo que tiene características de codificación de datos;

la figura 20B es una vista del fiducial del que se ha obtenido imágenes de una manera que proporciona una descodificación robusta de las características;

35 la figura 20C es una representación esquemática de características de ejemplo para codificar los datos en los ejemplos de las figuras 20A y 20B;

40 la figura 21A es una vista en perspectiva en corte de una parte de una matriz con patrón de ejemplo que tiene un fiducial que refleja al menos parcialmente la radiación recibida durante la obtención de imágenes u otro procesamiento;

la figura 21B es una vista parcialmente en sección transversal, recortada, de un fiducial de ejemplo del tipo mostrado en la figura 21A;

45 la figura 22A es una vista parcialmente en sección transversal, recortada, de un ejemplo de un fiducial reflectante que puede incluir características que codifican datos o ayudan en la obtención de imágenes o el procesamiento, tal como una rejilla de Bragg;

50 la figura 22B es una vista recortada de un ejemplo de un fiducial reflectante que puede incluir características que codifican datos o ayudan en la obtención de imágenes o el procesamiento, tal como una rejilla de Bragg; y

la figura 23 es un diagrama de flujo que ilustra una lógica de ejemplo para usar los fiduciales expuestos en la presente descripción.

55 Descripción detallada

La presente invención se define en las reivindicaciones 1 y 10.

60 La siguiente descripción proporciona métodos y sistemas para el procesamiento, la obtención de imágenes y el análisis de datos de imagen que son útiles para ubicar características de matrices con patrón. Los sistemas y métodos pueden usarse para poner en correspondencia exacta múltiples imágenes de tales matrices con patrón. Son relevantes para las presentes técnicas matrices con patrón cuyo procesamiento produce datos de imagen (o cualquier otra forma de salida de detección de sitios sobre la matriz) de matrices analíticas, tal como las usadas para el análisis de muestras biológicas. Tales matrices pueden contener patrones de repetición de características que han de resolverse en intervalos de resolución submicrométrica, para los que los métodos y sistemas de la presente descripción son muy adecuados. Aunque los sistemas y métodos expuestos en la presente memoria proporcionan ventajas cuando se

analizan patrones regulares de características, se entenderá que también pueden usarse para distribuciones aleatorias de características. Como se discute a continuación, en muchas aplicaciones, el material del que se van a obtener imágenes y a analizar se ubicará sobre una o más superficies de uno o más soportes, tal como un material de vidrio. Pueden usarse perlas u otros dispositivos de localización en sitios para unir o anclar (o para localizar de otro modo) segmentos de material que se van a procesar (por ejemplo, hibridar, combinar con moléculas adicionales, obtenerse imágenes y analizar). En algunos casos, las moléculas que se van a procesar pueden estar ubicadas de manera aleatoria o pseudoaleatoria sobre el soporte. Marcadores fiduciales, o simplemente “fiduciales”, están ubicados en ubicaciones conocidas con respecto a los sitios, tal como sobre o en uno o más soportes, para ayudar a localizar el soporte en el sistema (por ejemplo, para la obtención de imágenes) y para localizar los sitios en datos de imagen posteriores.

Puede hacerse notar que, tal como se usa en la presente descripción, una “matriz con patrón” puede incluir una micromatriz, una nanomatriz, una matriz de secuenciación formada como una celda de flujo con patrón, etc. Tales dispositivos comprenden sitios en los que se pueden ubicar analitos para su procesamiento y análisis. En la práctica, los sitios pueden disponerse en un patrón de repetición, un patrón de no repetición o en una disposición aleatoria en una o más superficies de un soporte, que a su vez puede comprender una celda de flujo como se discute a continuación. Para simplificar, se hace referencia a todos estos dispositivos y se debe entender que están incluidos en el término “matriz con patrón” o, a veces, simplemente “matriz”.

Los sistemas y métodos de la presente descripción son robustos frente a cambios en las propiedades de las características en el patrón u organización de los sitios. Los cambios pueden manifestarse como diferentes propiedades de señal detectadas para una o más características en diferentes imágenes. Por ejemplo, en una técnica de secuenciación de ácidos nucleicos, una matriz de ácidos nucleicos se somete a diversos ciclos de procesamiento bioquímico y obtención de imágenes bioquímicos. En algunos ejemplos, cada ciclo puede dar como resultado la detección de una de cuatro etiquetas diferentes en cada característica, dependiendo de la base de nucleótidos que se procesa bioquímicamente en ese ciclo. En tales ejemplos, se obtienen múltiples (por ejemplo, cuatro) imágenes diferentes en un ciclo dado y cada característica se detectará en las imágenes. En un ejemplo, la alineación de las imágenes para un ciclo dado presenta desafíos únicos ya que las características que se detectan en una imagen pueden aparecer oscuras en las otras imágenes. Además, la secuenciación incluye múltiples ciclos y la alineación de características representadas en datos de imagen de ciclos sucesivos se usa para determinar la secuencia de nucleótidos en cada sitio basándose en la secuencia de etiquetas detectadas en el sitio respectivo. La puesta en correspondencia exacta incorrecta de las imágenes dentro de un ciclo o la puesta en correspondencia exacta incorrecta de imágenes a lo largo de diferentes ciclos puede afectar negativamente al análisis de secuencia. Por ejemplo, los métodos que emplean patrones regulares pueden ser susceptibles de errores de abandono durante el análisis de imagen. En un ejemplo, se produce un error de abandono cuando dos imágenes superpuestas están desplazadas en una o más unidades de repetición del patrón, de tal manera que los patrones parecen superponerse pero las características que son vecinas en los diferentes patrones están correlacionadas incorrectamente en la superposición.

Como se usa en la presente memoria, el término “fiducial” pretende significar un punto de referencia distinguible en o sobre un objeto, tal como un soporte o sustrato con sitios para que se analicen materiales moleculares, así como en datos de imagen del objeto. El punto de referencia puede ser, por ejemplo, una marca, un objeto, una forma, un borde, un área, una irregularidad, un canal, un pozo, un poste o, como en muchos casos, una colección de características en ubicaciones conocidas que pueden usarse como referencia. El punto de referencia puede detectarse en una imagen del objeto o en otro conjunto de datos derivados de la detección (por ejemplo, detección de imágenes) del objeto. El punto de referencia se puede especificar mediante una coordenada X y/o Y en un plano del objeto (por ejemplo, una o más superficies de la matriz con patrón). Alternativa o adicionalmente, el punto de referencia puede especificarse mediante una coordenada Z que sea ortogonal al plano X-Y, por ejemplo, que está definida por las ubicaciones relativas del objeto y un detector. Se pueden especificar una o más coordenadas para un punto de referencia en relación con una o más otras características de un objeto o de una imagen u otro conjunto de datos derivado del objeto.

A continuación se describirán varios ejemplos con respecto a fiduciales, su forma, su configuración y su uso en sistemas y métodos de análisis. Se entenderá que también se proporcionan sistemas para llevar a cabo los métodos de forma automatizada o semiautomatizada, y tales sistemas incluirán un procesador; un dispositivo de almacenamiento de datos; y un programa para análisis de imágenes, incluyendo el programa instrucciones para llevar a cabo uno o más de los métodos discutidos a continuación. En consecuencia, los métodos expuestos en la presente memoria se pueden llevar a cabo en un ordenador, por ejemplo, que tiene los componentes y algoritmos necesarios para ese fin.

Los métodos y sistemas expuestos en la presente memoria son útiles para analizar cualquiera de una variedad de materiales, tal como muestras biológicas y moléculas que pueden estar sobre o en una variedad de objetos. Objetos útiles son soportes sólidos o superficies de fase sólida con analitos unidos. Los métodos y sistemas expuestos pueden proporcionar ventajas cuando se usan con objetos que tienen un patrón de repetición de características en un plano X-Y, tal como una matriz con patrón que tiene una colección de moléculas unidas, tal como ADN, ARN, material biológico de virus, proteínas, anticuerpos, carbohidratos, moléculas pequeñas (tal como candidatos a fármacos), moléculas biológicamente activas o cualquier otro analito de interés.

Se ha desarrollado un número creciente de aplicaciones para matrices con características que tienen moléculas biológicas, tal como ácidos nucleicos y polipéptidos. Tales matrices con patrón pueden incluir sondas de ADN o ARN. Estas son específicas de secuencias de nucleótidos presentes en plantas, animales (por ejemplo, seres humanos) y otros organismos. En algunas aplicaciones, por ejemplo, se pueden unir sondas de ADN o ARN individuales en características o sitios individuales de una matriz. Una muestra de prueba, tal como de una persona u organismo conocido o desconocido, puede exponerse a la matriz, de tal manera que los ácidos nucleicos diana (por ejemplo, fragmentos de genes, ARNm o amplicones de los mismos) hibridan con sondas complementarias en características o sitios respectivos en la matriz. Las sondas se pueden marcar en un proceso específico de diana (por ejemplo, debido a etiquetas presentes en los ácidos nucleicos diana o debido al marcaje enzimático de las sondas o dianas que están presentes en forma hibridada en las características). La matriz se puede examinar después, por ejemplo escaneando frecuencias específicas de luz sobre las características para identificar qué ácidos nucleicos diana están presentes en la muestra.

Se pueden usar matrices con patrón biológicas para secuenciación genética y aplicaciones similares. En general, la secuenciación genética incluye determinar el orden de los nucleótidos en una longitud de ácido nucleico diana, tal como un fragmento de ADN o ARN. En cada característica pueden secuenciarse secuencias relativamente cortas, y la información de secuencia resultante puede usarse en varios métodos bioinformáticos para ajustar lógicamente los fragmentos de secuencia entre sí para determinar de manera fiable la secuencia de longitudes mucho más extensas de material genético a partir de la cual se encuentran disponibles los fragmentos. Algoritmos automatizados basados en ordenador para caracterizar fragmentos se han desarrollado y se han usado más recientemente en el mapeo del genoma, la identificación de genes y su función, etc. Las matrices con patrón son útiles para caracterizar el contenido genómico porque está presente un gran número de variantes y esto reemplaza la alternativa de realizar muchos experimentos sobre sondas y dianas individuales. La matriz con patrón puede ser un formato deseable para realizar tales investigaciones de manera práctica.

Como se ha hecho notar anteriormente, cualquiera de una variedad de matrices de analito (también denominadas en la presente descripción "matrices con patrón" o simplemente "matrices") conocidas en la técnica se puede usar en un método o sistema establecido en la presente memoria. Tales matrices contienen características, teniendo, cada una, una sonda individual o una población de sondas. En el último caso, la población de sondas en cada característica puede ser homogénea teniendo una sola especie de sonda. Por ejemplo, en el caso de una matriz de ácido nucleico, cada característica puede tener múltiples moléculas de ácido nucleico cada una con una secuencia común. Sin embargo, en algunos ejemplos distintos, las poblaciones en cada característica de una matriz pueden ser heterogéneas. De manera similar, las matrices de proteínas pueden tener características con una sola proteína o una población de proteínas que pueden tener o no la misma secuencia de aminoácidos. Las sondas se pueden unir a la superficie de una matriz, por ejemplo, mediante enlace covalente de las sondas a la superficie o mediante interacción no covalente de las sondas con la superficie. En algunos ejemplos, sondas, tal como moléculas de ácido nucleico, pueden unirse a una superficie a través de una capa de gel como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 9.012.022 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2011/0059865 A1, a la que se debe hacer referencia adicional.

Matrices de ejemplo incluyen, sin limitación, una matriz BeadChip™ disponible de Illumina, Inc., u otros incluyendo aquellos en los que las sondas se unen a perlas que están presentes en una superficie (por ejemplo, perlas en pocillos sobre una superficie) tal como las descritas en las patentes estadounidenses n.º 6.266.459; 6.355.431; 6.770.441; 6.859.570; o 7.622.294; o la publicación PCT n.º WO 00/63437, a la que se debe hacer referencia adicional. Ejemplos adicionales de matrices con patrón comercialmente disponibles que se pueden usar incluyen, por ejemplo, GeneChip® disponible de Affymetrix (parte de Thermo Fisher Scientific). Matrices con patrones, u otras matrices con patrón sintetizadas según técnicas a veces denominadas tecnologías de VLSIPSTM ((Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis (síntesis de polímeros inmovilizados a muy gran escala)), disponibles de VLSIP Technologies. También se puede usar una matriz con patrón de manchas en un método o sistema según algunos ejemplos de la presente descripción. Una matriz con patrón de puntos de ejemplo es una matriz CodeLink™ disponible de Amersham Biosciences. Otra matriz con patrón que puede ser útil es una que se fabrica usando métodos de impresión por chorro de tinta tal como la tecnología SurePrint™ disponible de Agilent Technologies.

Otras matrices útiles incluyen aquellas que se usan en aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, las matrices que tienen amplicones de fragmentos genómicos (a menudo denominados grupos) son útiles, tal como las descritas en Bentley y col., Nature 456:53-59 (2008), documentos WO 04/018497; WO 91/06678; WO 07/123744; patentes estadounidenses n.º 7.329.492; 7.211.414; 7.315.019; 7.405.281 o 7.057.026; o la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2008/0108082 A1, a la que se debe hacer referencia adicional. Otro tipo de matriz que es útil para la secuenciación de ácidos nucleicos es una matriz de partículas producidas a partir de una técnica de PCR en emulsión. Los ejemplos se describen en Dressman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:8817-8822 (2003), el documento WO 05/010145, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0130173 A1 o la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0064460 A1, a la que se debe hacer referencia adicional.

Las matrices usadas para la secuenciación de ácidos nucleicos tienen frecuentemente patrones espaciales aleatorios de características de ácido nucleico. Por ejemplo, las plataformas de secuenciación HiSeq™ o MiSeq™ disponibles de Illumina Inc. utilizan celdas de flujo que comprenden soportes o matrices sobre las cuales se dispone(n) ácido(s) nucleico(s) mediante siembra aleatoria seguida de amplificación de puente. Sin embargo, también se pueden usar matrices con patrón para la secuenciación de ácidos nucleicos u otras aplicaciones analíticas. Matrices con patrón, métodos para su fabricación y métodos para su uso de ejemplo se exponen las patentes de los EE. UU. n.º 9.512.422; 8.895.249; y 9.012.022; y en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.º 2013/0116153 A1; y 2012/0316086 A1, a las que se debe hacer referencia adicional. Las características de tales matrices con patrón se pueden usar para capturar una única molécula de molde de ácido nucleico para sembrar la formación posterior de una colonia homogénea, por ejemplo, mediante amplificación en puente. Tales matrices con patrón son útiles para aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos.

El tamaño de características, tal como sitios en una matriz (u otro objeto usado en un método o sistema en la presente memoria), se puede seleccionar para adaptarse a una aplicación deseada. En algunos ejemplos, una característica de una matriz puede tener un tamaño que acomoda solo una única molécula de ácido nucleico. Una superficie que tiene una pluralidad de características en este rango de tamaño es útil para construir una matriz de moléculas para la detección con resolución de una sola molécula. Las características en este rango de tamaño también son útiles en matrices que tienen características que contienen, cada una, una colonia de moléculas de ácido nucleico. Por lo tanto, cada una de las características de una matriz puede tener un área que no es mayor que aproximadamente 1 mm², no mayor que aproximadamente 500 µm², no mayor que aproximadamente 100 µm², no mayor que aproximadamente 10 µm², no mayor que aproximadamente 1 µm², no mayor que aproximadamente 500 nm², o no mayor que aproximadamente 100 nm², no mayor que aproximadamente 10 nm², no mayor que aproximadamente 5 nm², o no mayor que aproximadamente 1 nm². Alternativa o adicionalmente, las características de una matriz no serán menores que aproximadamente 1 mm², no menores que aproximadamente 500 µm², no menores que aproximadamente 100 µm², no menores que aproximadamente 10 µm², no menores que aproximadamente 1 µm², no menores que aproximadamente 500 nm², no menores que aproximadamente 100 nm², no menores que aproximadamente 10 nm², no menores que aproximadamente 5 nm², o no menores que aproximadamente 1 nm². De hecho, una característica puede tener un tamaño que esté en un intervalo entre un límite superior e inferior seleccionado entre los ilustrados anteriormente. Aunque se han ilustrado varios intervalos de tamaño para características de una superficie con respecto a ácidos nucleicos y en la escala de ácidos nucleicos, se entenderá que las características en estos intervalos de tamaño se pueden usar para aplicaciones que no incluyen ácidos nucleicos. Se entenderá además que el tamaño de las características no tiene por qué limitarse necesariamente a una escala usada para aplicaciones de ácidos nucleicos.

Para ejemplos que incluyen un objeto (por ejemplo, una matriz o soporte) que tiene una pluralidad de características o sitios, las características pueden ser discretas, estando separadas por espacios entre sí. Una matriz útil en las presentes técnicas puede tener características que están separadas por una distancia de borde a borde de como máximo aproximadamente 100 µm, aproximadamente 50 µm, aproximadamente 10 µm, aproximadamente 5 µm, aproximadamente 1 µm, aproximadamente 0,5 µm o menos. Alternativa o adicionalmente, una matriz puede tener características que están separadas por una distancia de borde a borde de al menos aproximadamente 0,5 µm, aproximadamente 1 µm, aproximadamente 5 µm, aproximadamente 10 µm, aproximadamente 50 µm, aproximadamente 100 µm o más. Estos rangos pueden aplicarse al espaciado promedio de borde a borde para características, así como al espaciado mínimo o máximo.

En algunos ejemplos, las características de una matriz no necesitan ser discretas y, en cambio, características vecinas pueden colindar entre sí. Tanto si las características son discretas como si no, el tamaño de las características y/o el espaciado de las características pueden variar de tal manera que las matrices pueden tener una densidad deseada. Por ejemplo, el espaciado de característica promedio en un patrón regular puede ser como máximo de aproximadamente 100 µm, aproximadamente 50 µm, aproximadamente 10 µm, aproximadamente 5 µm, aproximadamente 1 µm o aproximadamente 0,5 µm o menos. De manera alternativa o adicional, el espaciado de característica promedio en un patrón regular puede ser al menos aproximadamente 0,5 µm, aproximadamente 1 µm, aproximadamente 5 µm, aproximadamente 10 µm, aproximadamente 50 µm o aproximadamente 100 µm o más. Estos intervalos pueden aplicarse también al espaciado máximo o mínimo para un patrón regular. Por ejemplo, el espaciado de característica máximo para un patrón regular puede ser como máximo de aproximadamente 100 µm, aproximadamente 50 µm, aproximadamente 10 µm, aproximadamente 5 µm, aproximadamente 1 µm o aproximadamente 0,5 µm o menos; y/o el espaciado de característica mínimo en un patrón regular puede ser al menos aproximadamente 0,5 µm, aproximadamente 1 µm, aproximadamente 5 µm, aproximadamente 10 µm, aproximadamente 50 µm o aproximadamente 100 µm o más.

La densidad de características en una matriz también se puede entender en términos del número de características presentes por área unitaria. Por ejemplo, la densidad promedio de características de una matriz puede ser al menos aproximadamente 1×10³ características/mm², aproximadamente 1×10⁴ características/mm², aproximadamente 1×10⁵ características/mm², aproximadamente 1×10⁶ características/mm², aproximadamente 1×10⁷ características/mm², aproximadamente 1×10⁸ características/mm², o aproximadamente 1×10⁹ características/mm² o más. Alternativa o adicionalmente, la densidad promedio de características de una matriz puede ser como máximo aproximadamente 1×10⁹ características/mm², aproximadamente 1×10⁸ características/mm²,

aproximadamente 1×10^7 características/mm², aproximadamente 1×10^6 características/mm², aproximadamente 1×10^5 características/mm², aproximadamente 1×10^4 características/mm², o aproximadamente 1×10^3 características/mm² o menos.

5 Las características en un ejemplo con patrón pueden tener cualquiera de una variedad de formas y organizaciones de patrón. Por ejemplo, cuando se observan en un plano bidimensional, tal como en la superficie de una matriz, las características pueden aparecer redondeadas, circulares, ovaladas, rectangulares, cuadradas, simétricas, asimétricas, triangulares, poligonales o similar. Las características pueden disponerse en un patrón de repetición regular incluyendo, por ejemplo, un patrón hexagonal o rectilíneo. Se puede seleccionar un patrón para lograr el nivel deseado de empaquetamiento. Por ejemplo, características redondas se empaquetan de manera óptima en una disposición hexagonal. Por supuesto, también se pueden usar otras disposiciones de empaquetamiento para características redondas y viceversa.

15 En general, un patrón podría caracterizarse en términos del número de características que están presentes en un subconjunto que forma la unidad geométrica más pequeña del patrón. El subconjunto puede incluir, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 10 o más características. Dependiendo del tamaño y la densidad de las características, la unidad geométrica puede ocupar un área de menos de aproximadamente 1 mm², aproximadamente 500 μm², aproximadamente 100 μm², aproximadamente 50 μm², aproximadamente 10 μm², aproximadamente 1 μm², aproximadamente de 500 nm², aproximadamente 100 nm², aproximadamente 50 nm², o aproximadamente 10 nm² o menos. Alternativa o adicionalmente, la unidad geométrica puede ocupar un área mayor que aproximadamente 10 nm², aproximadamente 50 nm², aproximadamente 100 nm², aproximadamente 500 nm², aproximadamente 1 μm², aproximadamente 10 μm², aproximadamente 50 μm², aproximadamente 100 μm², aproximadamente 500 μm², o aproximadamente 1 mm² o más. Las propiedades de las características en una unidad geométrica, tal como forma, tamaño, espaciado y similares, pueden seleccionarse entre las expuestas en la presente memoria de manera más general con respecto a características en una matriz o patrón.

30 Una matriz que tiene un patrón regular de características puede ser ordenada con respecto a las ubicaciones relativas de las características pero aleatoria con respecto a una o más propiedades distintas de cada característica. Por ejemplo, en el caso de una matriz de ácido nucleico, las características de ácido nucleico pueden ordenarse con respecto a sus ubicaciones relativas pero ser aleatorias con respecto al conocimiento propio de la secuencia para las especies de ácido nucleico presentes en cualquier característica. Como ejemplo más específico, las matrices de ácido nucleico formadas sembrando un patrón de repetición de características con ácidos nucleicos de molde y amplificando el molde en cada característica para formar copias del molde en la característica (por ejemplo, mediante amplificación en agrupación o amplificación en puente) tendrán una patrón regular de características de ácido nucleico pero será aleatorio con respecto a la distribución de secuencias de los ácidos nucleicos a lo largo de la matriz. Por lo tanto, la detección de la presencia de material de ácido nucleico en la matriz puede producir un patrón de repetición de características, mientras que una detección específica de secuencia puede producir una distribución de no repetición de señales a lo largo de la matriz.

40 Se entenderá que la descripción en la presente memoria de patrones, orden, aleatoriedad y similares se refiere no solo a características sobre objetos, tal como características sobre matrices, sino también a características en datos de imagen o, cuando se producen, de imágenes reales. Como tal, patrones, orden, aleatoriedad y similares pueden estar presentes en cualquiera de una variedad de formatos que se usan para almacenar, manipular o comunicar datos de imagen incluyendo, aunque no de forma limitativa, un medio legible por ordenador o un componente de ordenador tal como una interfaz gráfica de usuario u otro dispositivo de salida.

50 Los fiduciales se incluyen sobre o en las matrices contempladas en la presente descripción, tal como sobre una o más superficies de soportes o sustratos de matriz con patrón (ya sea en una matriz o en cualquier organización aleatoria o de otro tipo), así como en datos de imagen de los sitios y moléculas para facilitar la identificación y localización de características individuales sobre la matriz, incluyendo los sitios en los que se ubican las moléculas. Los fiduciales son útiles para poner en correspondencia exacta las ubicaciones espaciales de sitios o características, ya que los fiduciales proporcionan un punto de referencia para ubicaciones relativas de tales sitios o características. Los fiduciales son especialmente beneficiosos para aplicaciones en las que un soporte y sitios se detectan repetidamente para seguir cambios que tienen lugar en sitios individuales a lo largo del tiempo y ciclos sucesivos de procesamiento. Por ejemplo, los fiduciales pueden permitir que se sigan agrupaciones de ácidos nucleicos individuales a través de imágenes sucesivas obtenidas durante múltiples ciclos de secuenciación, de tal manera que la secuencia de especies de ácido nucleico presentes en agrupaciones individuales pueda determinarse con precisión.

60 Volviendo ahora a los dibujos, y haciendo referencia en primer lugar a la figura 1, se ilustra un sistema 10 de análisis de ejemplo para el procesamiento de matrices con patrón (tal como para aplicaciones biológicas), la obtención de imágenes de las matrices con patrón y el análisis de datos derivados de la obtención de imágenes. En el ejemplo ilustrado, el sistema 10 está diseñado para introducir moléculas, tal como nucleótidos, oligonucleótidos y otros reactivos bioactivos, en muestras (S) 12 que pueden prepararse con antelación. El sistema 10 puede diseñarse para sintetizar biopolímeros, tal como cadenas de ADN, o para secuenciar biopolímeros. Se ha hecho notar que la presente técnica no se limita de ninguna manera a operaciones de secuenciación, operaciones de expresión génica, aplicaciones de diagnóstico o una cualquiera de estas, sino que puede usarse en cualquiera de ellas para analizar

datos de imagen recogidos para múltiples franjas o regiones detectadas en regiones de una muestra como se describe a continuación. Otros sustratos que contienen matrices de moléculas u otras características detectables pueden usarse de manera similar en las técnicas y sistemas descritos.

5 Sin embargo, en el ejemplo ilustrado, los biopolímeros de ejemplo podrían incluir ácidos nucleicos, tal como ADN, ARN o análogos de ADN o ARN. Otros biopolímeros de ejemplo podrían incluir proteínas (también denominadas polipéptidos), polisacáridos o análogos de los mismos. Aunque se puede usar cualquiera de una variedad de biopolímeros, en aras de la claridad, los sistemas y métodos usados para el procesamiento y la obtención de imágenes en el contexto de ejemplo ilustrado en la figura 1 se describirá con respecto al procesamiento de ácidos nucleicos. En
10 general, el sistema ilustrado en la figura 1 actuará sobre muestras 12 que pueden incluir una matriz de sitios de reacción. De nuevo en este caso, como se usa en la presente memoria, el término “matriz” o “matriz con patrón” se refiere a un soporte que tiene una población de diferentes sitios de reacción en uno o más sustratos, de tal manera que diferentes sitios de reacción se pueden diferenciar entre sí según su ubicación relativa. Se puede unir una única especie de biopolímero a cada sitio de reacción individual. Sin embargo, se pueden unir múltiples copias de una especie de biopolímero a un sitio de reacción. La matriz, tomada como un todo, puede incluir una pluralidad de biopolímeros diferentes unidos en una pluralidad de sitios diferentes. Los sitios de reacción pueden ubicarse en diferentes ubicaciones direccionables sobre el mismo sustrato. Alternativamente, una matriz puede incluir sustratos separados, tal como perlas, formando cada uno un sitio de reacción diferente. Los sitios pueden incluir fragmentos de ADN unidos en ubicaciones específicas en una matriz, o pueden ser pocillos en los que se va a sintetizar un producto
20 objetivo. En algunas aplicaciones, el sistema puede diseñarse para sintetizar o secuenciar moléculas de manera continua, tal como moléculas poliméricas basadas en nucleótidos comunes.

En la representación esquemática de la figura 1, el sistema de análisis 10 puede incluir un sistema 14 de procesamiento diseñado para procesar muestras 12, tal como matrices con patrón biológicas, y para generar datos de imagen representativos de sitios individuales en la matriz con patrón, así como espacios entre sitios y representaciones de fiduciales proporcionados en o sobre el soporte de matriz con patrón. Un sistema de análisis de datos 16 recibe los
25 datos de la imagen y procesa los datos de imagen según la presente descripción, para extraer valores significativos de los datos de la imagen como se describe a continuación. A continuación, un sistema de procesamiento/almacenamiento posterior 18 puede recibir esta información y almacenar la información, junto con datos de imágenes, cuando se desee. El sistema 16 de procesamiento/almacenamiento aguas abajo puede analizar adicionalmente los datos de imagen o los datos derivados de los datos de imagen, tal como para diagnosticar condiciones fisiológicas, compilar listas de secuenciación, analizar la expresión génica, etc.

El sistema 14 de procesamiento puede emplear un sistema 20 de suministro de reactivos de biomoléculas (mostrado como un sistema de administración de nucleótidos en la figura 1) para suministrar diversos reactivos a una muestra 12 a medida que avanza el procesamiento. El sistema 14 puede incluir una pluralidad de operaciones a través de las cuales progresan las muestras 12 y los recipientes de muestras. Esta progresión se puede lograr de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, movimiento físico de la muestra 12 a diferentes estaciones, o carga de la matriz en un sistema en el que se mueve la matriz o se mueve un sistema óptico, o ambos, o el suministro de fluidos se realiza mediante el accionamiento de una válvula. Se puede diseñar un sistema para operación cíclica en la que se promueven reacciones con nucleótidos individuales o con oligonucleótidos, seguido de lavado, obtención de imágenes y desbloqueo en preparación para un ciclo posterior. En un sistema práctico, las muestras 12 se disponen en el sistema y se realiza una secuencia automatizada o semiautomatizada de operaciones para reacciones, lavado, obtención de imágenes, desbloqueo, etc., en varios ciclos sucesivos antes de que se extraiga toda la información útil de la muestra de prueba.
45 De nuevo, debe hacerse notar que el proceso ilustrado en la figura 1 no es de ninguna manera limitante, y las presentes técnicas pueden operar sobre datos de imagen adquiridos de cualquier sistema adecuado empleado para cualquier aplicación. Debe hacerse notar que si bien en la presente descripción se hace referencia a “obtención de imágenes” o “datos de imagen”, en muchos sistemas prácticos esto implicará la obtención de imágenes ópticas reales y la extracción de datos de circuitos de detección electrónicos (por ejemplo, cámaras o circuitos electrónicos de obtención de imágenes o chips), aunque también se pueden emplear otras técnicas de detección, y los datos detectados resultantes que caracterizan las moléculas de interés también deben considerarse como “imágenes” o “datos de imagen”.

En el ejemplo ilustrado en la figura 1, el sistema 20 de suministro de nucleótidos proporciona una corriente 22 de proceso a las muestras 12. Una corriente 24 de efluente de la matriz o celda de flujo puede recapturarse y recircularse, por ejemplo, en el sistema 20 de suministro de nucleótidos. A continuación, en el ejemplo ilustrado, la matriz o celda de flujo se puede lavar en una estación 26 de lavado (o en muchos casos mediante lavado mediante el accionamiento de válvulas apropiadas) para eliminar reactivos adicionales y aclarar la muestra 12 para la obtención de imágenes. La muestra 12 se expone después a un sistema 28 de imagenología (que puede estar dentro del mismo dispositivo)
60 donde se pueden generar datos de imagen que se pueden analizar, por ejemplo, para la determinación de la secuencia de una cadena de nucleótidos que se construye progresivamente, tal como basándose en un molde. En el ejemplo contemplado actualmente, el sistema 28 de imagenología puede emplear un escaneo de línea confocal para producir datos de imagen pixelados progresivos que pueden analizarse para localizar sitios individuales en una matriz y para determinar el tipo de nucleótido que se ha unido o enlazado más recientemente a cada sitio. También pueden emplearse adecuadamente otras técnicas de obtención de imágenes, tales como técnicas en las que uno o más puntos
65

de radiación se escanean a lo largo de la muestra o técnicas que emplean enfoques de obtención de imágenes *step and shoot* (“avance y disparo”).

Como se ha hecho notar, los componentes de obtención de imágenes del sistema 28 pueden considerarse más generalmente un “aparato de detección”, y puede ser útil cualquier aparato de detección que sea capaz de obtener imágenes de alta resolución de superficies. En algunos ejemplos, el aparato de detección tendrá resolución suficiente para distinguir características en las densidades, espaciados y/o tamaños de característica expuestos en la presente memoria. Ejemplos del aparato de detección son aquellos que están configurados para mantener un objeto y un detector en una relación estática mientras se obtiene una imagen de área. Como se ha hecho notar, se puede usar un aparato de escaneo, así como sistemas que obtienen imágenes de áreas sucesivas (por ejemplo, detectores de “avance y disparo”). Los detectores de escaneo de puntos mencionados anteriormente se pueden configurar para escanear un punto (es decir, un área de detección pequeña) sobre la superficie de un objeto a través de un movimiento reticular en el plano X-Y de la superficie. Los detectores de escaneo de líneas se pueden configurar para escanear una línea a lo largo de la dimensión Y de la superficie de un objeto, donde la dimensión más larga de la línea tiene lugar a lo largo de la dimensión X. Se entenderá que el dispositivo de detección, el objeto o ambos pueden moverse para conseguir la detección por escaneo. Los aparatos de detección que son útiles, por ejemplo en aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos, se describen en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.º n.º 2012/0270305 A1; 2013/0023422 A1; y 2013/0260372 A1; y las patentes estadounidenses n.º 5.528.050; 5.719.391; 8.158.926 y 8.241.573, a las que se debe hacer referencia adicional.

Después de la obtención de imágenes (por ejemplo, en el sistema 28 de imagenología), las muestras 12 pueden avanzar a una estación 30 de desbloqueo para el desbloqueo, durante el cual se escinde una molécula de bloqueo o un grupo protector del último nucleótido agregado, junto con un colorante marcador. Si el sistema 14 se usa para secuenciar, a modo de ejemplo, los datos de imagen del sistema 28 de imagenología se almacenarán y enviarán a un sistema de análisis de datos tal como se indica en el número de referencia 16.

El sistema 16 de análisis puede incluir un ordenador programado de propósito general o específico de aplicación, que proporciona una interfaz de usuario y un análisis automatizado o semiautomatizado de los datos de imagen para determinar cuál de los cuatro nucleótidos de ADN comunes puede haberse añadido en último lugar en cada uno de los sitios en una matriz de cada muestra, tal como se describe a continuación. Como apreciarán los expertos en la técnica, tal análisis se puede realizar basándose en el color de colorantes de marcado únicos para cada uno de los cuatro nucleótidos de ADN comunes. Estos datos de imagen pueden analizarse adicionalmente mediante el sistema 18 de procesamiento/almacenamiento posterior, que puede almacenar datos derivados de los datos de imagen tal como se describe a continuación, así como los datos de imagen en sí, cuando sea apropiado. De nuevo, se pretende que la aplicación de secuenciación sea un ejemplo, y se pueden llevar a cabo otras operaciones, tal como aplicaciones de diagnóstico, aplicaciones clínicas, experimentos de expresión génica, etc., que generarán datos de obtención de imágenes similares operados mediante las presentes técnicas.

Como se ha hecho notar anteriormente, en algunas implementaciones, la matriz con patrón puede permanecer en una posición fija, y las “estaciones” a las que se hace referencia pueden incluir subsistemas integrados que actúan sobre la matriz con patrón como se describe (por ejemplo, para introducción y reacción con las químicas deseadas, lavado, obtención de imágenes, recopilación de datos de imagen, etc.). El análisis de datos puede, nuevamente, realizarse simultáneamente con las otras operaciones de procesamiento, o puede realizarse un posprocesamiento accediendo a los datos de imagen, o a los datos derivados de los datos de imagen, desde una memoria apropiada (en el mismo sistema o en otro lugar). En muchas aplicaciones, un “contenedor” de matriz con patrón comprenderá un cartucho en el que se coloca la matriz con patrón y a través del cual circula la química deseada. En tales aplicaciones, la obtención de imágenes se puede realizar a través de la celda de flujo. La celda de flujo puede ubicarse apropiadamente (por ejemplo, en el plano X-Y) y moverse (por ejemplo, en las direcciones X, Y y Z) según sea necesario para la obtención de imágenes. Conexiones para la química deseada se pueden realizar directamente a la celda de flujo cuando está montada en el aparato. Además, dependiendo del diseño de dispositivo y de la técnica de obtención de imágenes usada, la matriz con patrón, encerrada en la celda de flujo, puede ubicarse inicialmente en el plano X-Y y moverse en este plano durante la obtención de imágenes, o los componentes de obtención de imágenes pueden moverse en paralelo a este plano durante la obtención de imágenes. En general, nuevamente en este caso, el “plano X-Y” es el plano de la superficie de matriz con patrón que soporta los sitios, o un plano paralelo a este. Por lo tanto, se puede decir que la celda de flujo se extiende en el plano X-Y, siendo la dirección X la dirección más larga de la celda de flujo y la dirección Y la dirección más corta (siendo las celdas de flujo rectangulares). Debe entenderse, sin embargo, que esta orientación podría invertirse. La celda de flujo y la matriz con patrón también se pueden mover en la dirección Z, que es la dirección ortogonal a las direcciones X e Y. Tales movimientos pueden ser útiles para asegurar la celda de flujo en su lugar, para realizar conexiones de fluido con la celda de flujo y para obtener imágenes (por ejemplo, enfocar la óptica para obtener imágenes de sitios en profundidades Z precisas). En algunas aplicaciones, la óptica se puede mover en la dirección X para obtener imágenes precisas.

La figura 2 ilustra un sistema 16 de análisis de datos de ejemplo y algunos de sus componentes funcionales en la medida en que se relacionan con las presentes técnicas. Como se ha hecho notar anteriormente, el sistema 16 puede incluir uno o más ordenadores programados, almacenándose la programación en uno o más medios legibles por máquina con código ejecutado para llevar a cabo los procesos descritos. En el ejemplo ilustrado, el sistema 16 incluye

una interfaz 32 diseñada para permitir la interconexión en red del sistema 16 con uno o más sistemas 28 de imagenología que adquieren datos de imagen de matrices con patrón. La interfaz puede recibir y acondicionar datos, cuando sea apropiado. Sin embargo, en general, el sistema 28 de imagenología emitirá datos de imagen digitales representativos de elementos o píxeles de imagen individuales que, juntos, forman una imagen de la matriz con patrón (o una parte de la misma). Un procesador, indicado con el número de referencia 34 en la figura 2, procesa los datos de imagen recibidos según una pluralidad de rutinas definidas por el código de procesamiento. El código de procesamiento puede almacenarse en varios tipos de circuitos de memoria, como se representa mediante el número de referencia 36 en la figura 2. Tal como se usa en esta descripción, el término “legible por máquina” significa detectable e interpretable por una máquina, tal como un ordenador, procesador, o un ordenador o procesador en cooperación con dispositivos o circuitos de detección e interpretación de señales (por ejemplo, componentes y circuitos de acceso a memoria y memoria de ordenador, aparatos de obtención de imágenes u otros aparatos de detección en cooperación con componentes y circuitos de procesamiento e interpretación de imágenes o señales), etc.

Ordenadores y procesadores útiles para las presentes técnicas pueden incluir circuitos especializados y/o dispositivos informáticos de propósito general, tal como un procesador que forma parte de un dispositivo de detección, interconectado en red con un dispositivo de detección usado para obtener los datos que se procesan por el ordenador, o separado del dispositivo de detección. En algunos ejemplos, la información (por ejemplo, datos de imagen) puede transmitirse entre componentes de un sistema 16 descrito en la presente memoria directamente o a través de una red informática. Una red de área local (LAN) o una red de área amplia (WAN) puede ser una red informática corporativa, incluyendo acceso a Internet, a la que están conectados ordenadores y dispositivos informáticos que componen el sistema 16. En un ejemplo, la LAN se ajusta al estándar industrial del Protocolo de control de transmisión/Protocolo de Internet (TCP/IP). En algunos casos, la información (por ejemplo, datos de imagen) se introduce en un sistema 16 descrito en la presente memoria a través de un dispositivo de entrada (por ejemplo, unidad de disco, reproductor de disco compacto, puerto USB, etc.). En algunos casos, la información se recibe cargando la información, tal como desde un dispositivo de almacenamiento tal como un disco o una unidad flash.

Como se ha hecho notar anteriormente, en algunos ejemplos, el circuito de procesamiento puede procesar datos de imagen en tiempo real o casi en tiempo real mientras se obtienen uno o más conjuntos de datos de imagen del soporte, sitios, moléculas, etc. Tal análisis en tiempo real es útil para aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos en donde una matriz de ácidos nucleicos se somete a ciclos repetidos de operaciones fluidicas y de detección. El análisis de los datos de secuenciación a menudo puede ser computacionalmente intensivo, de modo que puede resultar beneficioso realizar los métodos en tiempo real o casi en tiempo real o en segundo plano mientras otros algoritmos de análisis o adquisición de datos están en proceso. Métodos de análisis en tiempo real de ejemplo que se pueden usar con los presentes métodos son los usados para los dispositivos de secuenciación MiSeq™ y HiSeq™ comercialmente disponibles de Illumina, Inc. y/o que se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º n.º 2012/0020537 A1, a la que se debe hacer referencia adicional. Los términos “en tiempo real” y “casi en tiempo real”, cuando se usan junto con el procesamiento de muestras y su obtención de imágenes, pretenden implicar que el procesamiento tiene lugar al menos en parte durante el tiempo en el que las muestras se procesan y se obtienen imágenes de las mismas. En otros ejemplos, los datos de imagen se pueden obtener y almacenar para su análisis posterior mediante algoritmos similares. Esto puede permitir que otros equipos (por ejemplo, potentes sistemas de procesamiento) manejen las tareas de procesamiento en el mismo sitio físico o en otro diferente desde donde se realizan las imágenes. Esto puede permitir también el reprocesamiento, la verificación de calidad, etc.

Según los ejemplos de técnicas contemplados actualmente, el código de procesamiento ejecutado sobre los datos de imagen incluye una rutina 40 de análisis de datos de imagen diseñada para analizar los datos de imagen. El análisis de datos de imagen se puede usar para determinar las ubicaciones de sitios individuales visibles o codificados en los datos de imagen, así como ubicaciones en las que ningún sitio es visible (es decir, donde no hay ningún sitio o donde no se detectó radiación significativa de un sitio existente). El análisis de datos de imagen también se puede usar para determinar ubicaciones de fiduciales que ayuden a localizar los sitios. Aún más, el análisis de datos de imagen se puede usar para localizar la matriz con patrón en el sistema, para proporcionar información útil para fines de procesamiento o referencia, etc.

Como apreciarán los expertos en la técnica, en un entorno de obtención de imágenes de matriz con patrón biológica, las ubicaciones en la matriz con patrón, ya sea organizadas en un patrón de retícula o aleatoriamente, aparecerán más brillantes que ubicaciones sin sitio debido a la presencia de colorantes fluorescentes unidos a las moléculas de las que se obtienen imágenes. Se entenderá que no es necesario que los sitios aparezcan más brillantes que el área circundante, por ejemplo, cuando una diana para la sonda en el sitio no está presente en una muestra que se está detectando. El color en el que aparecen sitios individuales puede ser una función del colorante empleado, así como de la longitud de onda de la luz usada por el sistema 28 de imagenología para fines de obtención de imágenes. Sitios a los que los objetivos no están vinculados o que carecen de una etiqueta se pueden identificar según otras propiedades, tal como su ubicación esperada en la matriz con patrón. Cualquier marcador fiducial puede aparecer en una o más de las imágenes, dependiendo del diseño y función de los marcadores.

Una vez que la rutina 40 de análisis de datos de imagen ha localizado sitios individuales en los datos de imagen, se puede llevar a cabo una asignación de valor como se indica en el número de referencia 42, a menudo como una función de, o por referencia a, cualquier marcador fiducial proporcionado. En general, la asignación de valor realizada

en 42 asignará un valor digital a cada sitio basándose en las propiedades de los datos de imagen representados por píxeles en la ubicación correspondiente. Es decir, por ejemplo, la rutina 42 de asignación de valor puede diseñarse para reconocer que se detectó un color o longitud de onda de luz específico en una ubicación específica, como lo indica un grupo o agrupación de píxeles en la ubicación. En una aplicación de obtención de imágenes de ADN, por ejemplo, los cuatro nucleótidos comunes pueden representarse mediante colores separados y distinguibles (o más generalmente, longitudes de onda o intervalos de longitud de onda de luz). A cada color, a continuación, puede asignarse un valor correspondiente a ese nucleótido. La asignación de valor llevada a cabo por la rutina 42, a continuación, asignará el valor correspondiente a todo el sitio, aliviando la necesidad de procesar adicionalmente los datos de imagen en sí, que serán mucho más voluminosos (por ejemplo, muchos píxeles pueden corresponder a cada sitio) y de valores numéricos significativamente mayores (es decir, un número mucho mayor de bits para codificar cada píxel).

Una rutina 44 de asignación de indexación, a continuación, asociará cada uno de los valores asignados con una ubicación en un índice o mapa de imágenes, que, nuevamente, puede hacerse mediante referencia a ubicaciones conocidas o detectadas de marcadores fiduciales, o a cualquier dato codificado por dichos marcadores. Como se describe más detalladamente a continuación, el mapa corresponderá a las ubicaciones conocidas o determinadas de sitios individuales dentro de la muestra 12. Un algoritmo 46 de análisis de datos (mostrado como costura de datos 46 en la figura 2), que puede proporcionarse en el mismo dispositivo físico o en uno diferente, permite la identificación o caracterización de las moléculas de la muestra 12, así como el análisis lógico de los datos moleculares, cuando se desee. Para la secuenciación, por ejemplo, el algoritmo puede permitir la caracterización de las moléculas en cada sitio mediante referencia al espectro de emisión (es decir, si el sitio es detectable en una imagen, lo que indica que una etiqueta u otro mecanismo produjo una señal detectable cuando se excitó por una longitud de onda de luz). Las moléculas en los sitios y las moléculas subsiguientes detectadas en los mismos sitios pueden a continuación ensamblarse lógicamente en secuencias. A continuación, estas secuencias cortas pueden ser analizadas adicionalmente por el algoritmo 46 para determinar probables secuencias más largas en las que pueden ocurrir en el sujeto donante de muestra.

Puede hacerse notar que, como en la ilustración de la figura 2, se puede proporcionar una interfaz 38 de operador (OP), que puede consistir en una interfaz específica de dispositivo, o en algunas aplicaciones, a un monitor de ordenador, teclado, ratón, etc. convencional para interactuar con las rutinas ejecutadas por el procesador 34. La interfaz 38 de operador puede usarse para controlar, visualizar o interactuar de otro modo con las rutinas a medida que se procesan, analizan datos de imágenes y se indexan y procesan los valores resultantes.

La figura 3 ilustra una muestra de ejemplo o una matriz con patrón 12. Como se muestra en la figura 3, se puede proporcionar una pluralidad de retículas o franjas 48 de tal manera que cada una incluya una multitud de sitios individuales de los que se van a obtener imágenes. Como se ha hecho notar anteriormente, es posible una amplia gama de organizaciones para tales matrices con patrón, y las presentes técnicas no pretenden limitarse a ninguna organización deseada o particular. En un ejemplo de escaneo progresivo, a medida que avanza la obtención de imágenes, la muestra o matriz con patrón 12 se moverá en una dirección indexada D de modo que se pueda obtener imágenes de cada una de las retículas 48. Se pueden formar marcadores fiduciales iniciales (no mostrados), a veces denominados fiduciales de "alineación gruesa" o "de autocentrado" en o sobre el soporte, tal como para permitir ubicar adecuadamente las retículas o franjas 48, o para ubicar la matriz con patrón en un sistema 16 de procesamiento o sistema 28 de imagenología. Debe hacerse notar que en la vista de la figura 3, no se muestra la celda de flujo circundante en la que puede ubicarse la matriz con patrón.

La figura 4 es una ilustración ampliada de una de las franjas 48 de la matriz con patrón de la figura 3. Como se muestra en la figura 4, dependiendo de la técnica de imagenología empleada, la franja 48 puede escanearse por el sistema 28 de imagenología en líneas 52 de escaneo paralelas que se mueven progresivamente a lo largo de la franja 48. En la práctica, se puede escanear un punto sobre una región de la franja 48 correspondientemente a cada una de las líneas 52. Además, en muchos sistemas la matriz con patrón se moverá lentamente en una dirección, como indica la flecha 54, mientras que la óptica de obtención de imágenes permanecerá estacionaria. Las líneas 52 de escaneo paralelas resultarán entonces del movimiento progresivo de la muestra. Aunque no se muestra en la figura 4, cada franja 48 puede incluir regiones designadas como marcadores fiduciales de los que pueden obtenerse imágenes e identificarse de manera similar en datos de imagen resultantes.

En el ejemplo ilustrado, la retícula o franja 48 de la matriz con patrón tiene una anchura 56 que puede ser mayor que la longitud 58 de las líneas 52 de escaneo de las que el sistema 28 de imagenología es capaz de generar u obtener imágenes en cada pasada. Es decir, no se puede escanear ni obtener imágenes de la anchura 56 completa en una sola pasada. Esto puede deberse a la limitación inherente de la longitud 58 de línea debido a la óptica de imagenología, limitaciones relacionadas con el enfoque o el movimiento de componentes, tal como espejos u otros componentes ópticos usados para generar las líneas de escaneo, limitaciones en detectores digitales, etc. La franja 48 puede escanearse en múltiples pasadas y los valores para cada uno de los sitios pueden extraerse de los datos de imagen como se mencionó anteriormente.

En la figura 4, por ejemplo, la anchura 56 total de la franja 48 puede alojarse en dos áreas superpuestas 60 y 62. La anchura de cada área 60 y 62, tal como lo indican los números de referencia 64 y 66, respectivamente, será

ligeramente menor que la longitud 58 de las líneas 52 de escaneo. Esto permitirá la detección de una característica usada para integrar los valores derivados de los datos de imagen, tal como por referencia a un borde u otra característica. Puede hacerse notar que existe un área o superposición 68 común de la que se pueden obtener imágenes en ambas pasadas.

La figura 5 ilustra, con algo más de detalle, las líneas 52 de escaneo sobre una pluralidad de sitios 70 en la franja 48 ilustrada en la figura 4. Como se ha hecho notar anteriormente, en algunas implementaciones, los sitios 70 pueden organizarse en cualquier patrón de retícula adecuado, o incluso aleatoriamente. En el ejemplo ilustrado, los sitios 70 están organizados en un patrón hexagonal, aunque se pueden emplear patrones rectangulares y otros patrones. La ubicación de cada sitio 70 se conocerá con referencia a una o más características fiduciales, tal como un borde 72 de la retícula o una parte de la matriz con patrón. En el caso de ubicaciones de sitios aleatorias, éstas pueden ubicarse y mapearse mediante una secuencia de imágenes inicial diseñada para detectar la ubicación de todos los sitios de interés.

La figura 6 representa una parte de una imagen de ejemplo del tipo que se generará basándose en datos de imagen recogidos mediante escaneo progresivo de la región de interés en la matriz con patrón. La imagen real 74 está compuesta por un gran número de píxeles 76, cada uno de los cuales corresponde a un valor digital del sistema 28 de imagenología. Los datos de píxeles, que representan la imagen 74, codificarán valores correspondientes a píxeles brillantes 78 y a píxeles más oscuros 80. En la práctica, se pueden emplear varios niveles de gris o incluso codificación de color de manera que los sitios individuales 70 puedan identificarse detectando el contraste entre los píxeles como lo indican sus valores digitales individuales.

Antes de discutir algunas formas, tipos y usos de fiduciales contemplados actualmente, se proporciona en este caso una breve discusión de algoritmos o procesamiento de ejemplo para el uso, codificación y decodificación de datos y puesta en correspondencia exacta de datos de sitio y de imagen basados en las técnicas fiduciales descritas. La puesta en correspondencia exacta de fiduciales, y de esta manera de sitios 70, detectables en datos de imagen de operaciones de obtención de imágenes secuenciales, se puede llevar a cabo alineando (por ejemplo, localizando y superponiendo) los fiduciales, determinando la correlación cruzada bidimensional (u otra medida de la similitud de ajuste), por ejemplo, basándose en el número de píxeles brillantes 78 de los datos de imagen, y determinando el desplazamiento entre los fiduciales. El desplazamiento se puede determinar, por ejemplo, mediante un proceso iterativo mediante el cual se repiten las siguientes operaciones: uno de los fiduciales se desplaza con respecto al otro, se determina el cambio en el nivel de correlación de ajuste (por ejemplo, se indica un aumento en la correlación por un aumento en el número de píxeles brillantes 78 de fiduciales que se superponen), y una ubicación determinada de uno o más de los fiduciales se desplaza en una dirección que aumenta la correlación de ajuste. Las iteraciones pueden continuar hasta que se determina un desplazamiento que produce una correlación óptima o deseada. Se puede determinar una transformada basándose en el desplazamiento y la transformada se puede aplicar al resto de las características de la imagen objetivo. Por lo tanto, las ubicaciones de las características en una imagen objetivo se pueden determinar cambiando la escala relativa y/u orientación entre los datos de imagen, usando una transformada basándose en un desplazamiento determinado entre fiduciales en los datos de imagen cuando se superponen.

Se puede usar cualquiera de una variedad de modelos de transformada. Transformadas globales son útiles, incluyendo, por ejemplo, transformadas lineales o transformadas afines. Las transformaciones pueden incluir, por ejemplo, una o más de rotación, traslación, formación de depósitos calcáreos, corte o similares. Una transformada elástica o no rígida también puede resultar útil, por ejemplo, para ajustar las distorsiones en datos de detección o datos de referencia objetivo. Pueden surgir distorsiones cuando se usa un aparato de detección que escanea una línea a lo largo de la dimensión de un objeto, donde la dimensión más larga de la línea tiene lugar a lo largo de la dimensión X. Por ejemplo, las distorsiones por estiramiento pueden ocurrir a lo largo de la dimensión X (y a veces solo a lo largo de X). Pueden surgir distorsiones para otros detectores, incluyendo, por ejemplo, distorsiones de dispersión tanto en X como en Y resultantes de un detector de área. Se puede usar una transformada elástica o no rígida para corregir distorsiones, tal como distorsiones lineales presentes en datos de imagen obtenidos de instrumentos de escaneo de líneas, o distorsiones de dispersión presentes en datos de imagen obtenidos de detectores de área. Alternativa o adicionalmente, se puede aplicar un factor de corrección a los datos de referencia, los datos objetivo y/o la transformación para corregir las distorsiones introducidas (o que se espera que sean introducidas) por un aparato de detección. Para ejemplos en los que se obtienen imágenes de características con patrón, se puede aplicar una corrección no lineal a ubicaciones de características como una función de la posición X. Por ejemplo, la corrección no lineal que se aplica puede ser un polinomio de tercer orden para tener en cuenta la distorsión que surge del sistema óptico que se usó para la detección de las características.

Por lo tanto, al analizar los datos de imagen para identificar y localizar los fiduciales, los datos de referencia pueden contener información sobre la posición de un fiducial en un plano X-Y. Alternativa o adicionalmente, los datos de referencia pueden incluir información sobre la posición o los mismos u otros fiduciales en la dimensión Z. En el caso de datos de imágenes, el enfoque se puede alterar mediante la traslación a lo largo de la dimensión Z. Como tal, se puede usar un algoritmo para determinar el enfoque de las características de un objeto basándose en la comparación de un fiducial en un conjunto de datos de referencia con un fiducial en los datos de una imagen objetivo.

En algunos ejemplos, se pueden obtener datos de referencia a partir de la detección empírica de un objeto. Por ejemplo, se puede detectar un objeto en condiciones conocidas y el conjunto de datos resultante usado para la puesta en correspondencia exacta de datos posteriores adquiridos del mismo objeto (aunque en condiciones diferentes). Alternativamente, se puede detectar empíricamente un objeto modelo, estándar o de molde para crear datos de referencia. Estos datos de referencia se pueden usar para la puesta en correspondencia exacta de un objeto similar. En otros ejemplos, se pueden obtener datos de referencia a partir de un objeto teórico, tal como un diseño, mapa genético o especificación de fabricación para un objeto que se va a detectar posteriormente.

En algunos ejemplos, la información de puesta en correspondencia exacta se puede comunicar a un usuario a través de una interfaz gráfica de usuario (GUI). Sin embargo, los ejemplos de los métodos expuestos en la presente memoria se pueden llevar a cabo de manera automatizada que no requiere necesariamente la intervención humana. En consecuencia, en algunos ejemplos, la información de puesta en correspondencia exacta (por ejemplo, imágenes superpuestas de fiduciales) no se comunica a un usuario, ya sea a través de una GUI u otro formato.

Los métodos y sistemas descritos se pueden usar para una matriz de ácidos nucleicos que se ha sometido a cualquiera de una variedad de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos. Las técnicas aplicables pueden incluir aquellas donde los ácidos nucleicos se unen a características de una matriz de tal manera que sus posiciones relativas no cambian, y en donde la matriz se detecta repetidamente (por ejemplo, usando obtención de imágenes ópticas) a través de múltiples ciclos de secuenciación. Son aplicables ejemplos en los que se obtienen imágenes en diferentes canales de color, por ejemplo, coincidiendo con diferentes marcadores usados para distinguir un tipo de base de nucleótido de otro. En algunos ejemplos, el proceso para determinar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana puede ser un proceso automatizado. Los ejemplos pueden incluir técnicas de secuenciación por síntesis ("SBS"), disponibles de Illumina, Inc.

Los ácidos nucleicos se pueden secuenciar proporcionando diferentes nucleótidos (u oligonucleótidos) a una matriz de características para producir diferentes señales en cada característica, correspondiendo cada señal a una especie específica de nucleótido (u oligonucleótido) que se ha añadido a la característica. Por ejemplo, en el caso mencionado anteriormente donde se usan cuatro etiquetas diferentes, correspondientes a cuatro especies diferentes de nucleótido (u oligonucleótido), se pueden adquirir imágenes individuales, en donde cada imagen captura un único color (u otro tipo de señal) entre los cuatro colores posibles (o tipos de señal). En este ejemplo, el color de señal es diferente para cada una de las cuatro imágenes diferentes, produciendo de esta manera un ciclo de cuatro imágenes de color que corresponde a los cuatro nucleótidos posibles presentes en una posición en el ácido nucleico. Tales métodos pueden incluir además proporcionar nucleótidos (u oligonucleótidos) marcados adicionales a la matriz de moléculas, produciendo de esta manera una pluralidad de ciclos de imágenes de color. A continuación se exponen con más detalle algunos ejemplos de técnicas de secuenciación que producen imágenes de múltiples ciclos y, frecuentemente, múltiples imágenes por ciclo.

Debe hacerse notar que se pueden usar varias tecnologías de imagenología, longitudes de onda de luz y técnicas de procesamiento diferentes mientras se emplean las técnicas de marcadores fiduciales descritas. Por ejemplo, algunos sistemas pueden usar cuatro longitudes de onda o rangos de longitud de onda diferentes. Estos dependerán de los espectros de excitación y emisión de las etiquetas o marcadores usados para las moléculas de interés sobre el soporte. Por ejemplo, tales longitudes de onda pueden incluir aproximadamente 532 nm, aproximadamente 630 nm, aproximadamente 660 nm y aproximadamente 700 nm. Como apreciarán los expertos en la técnica, la secuenciación de colorante puede incluir "tagmentación" o amplificación (por ejemplo, mediante amplificación de ciclo reducido, amplificación de puente, amplificación clonal o la denominada secuencia por síntesis (SBS)), y las longitudes de onda usadas para la obtención de imágenes de sitios (y moléculas de interés) se adaptarán para el procesamiento usado. En algunas técnicas, por ejemplo, la química de secuenciación de dos colores puede permitir la distinción entre nucleótidos (por ejemplo, uno de dos colores, ningún color o ambos colores). En las últimas técnicas, las fuentes de luz usadas para la obtención de imágenes pueden emplear láseres que tienen dos longitudes de onda, tal como aproximadamente 532 nm y aproximadamente 660 nm. Los circuitos de detección pueden seleccionarse para permitir la detección en tales longitudes de onda para la obtención de imágenes, y su resolución o densidad de píxeles permitirá que un número suficiente de píxeles tenga valores detectables en los datos de imagen para la detección de sitios 70 con la resolución o densidad o los sitios 70 sobre el soporte.

Con respecto a los protocolos de detección, algunos ejemplos pueden utilizar menos restos de detección que el número de analitos seleccionados como diana para la detección. Por ejemplo, para detectar la incorporación de cuatro analitos (por ejemplo, durante una reacción de secuenciación), cada uno de los analitos puede marcarse y detectarse diferencialmente mediante uno de los cuatro filtros de excitación/emisión (por ejemplo, secuenciación fluorescente). Alternativamente, también se pueden utilizar métodos y sistemas en donde se usan un colorante, o una pluralidad de colorantes con características de detección similares, al detectar y diferenciar múltiples analitos diferentes. Como tal, el número de restos de detección utilizados es menor que el número de analitos que se detectan, lo que también puede servir para reducir el número de eventos de obtención de imágenes necesarios para determinar la presencia de los diferentes analitos. El uso de menos tipos de restos de detección puede proporcionar la ventaja de simplificar el dispositivo de detección necesario para diferenciar diferentes tipos de analitos. En cambio, la diferenciación se puede lograr basándose en el tratamiento diferencial de los analitos que conduce a su activación, inhibición, adición, eliminación, destrucción, extinción o mejora en diferentes puntos de tiempo que pueden detectarse por separado.

Sistemas y métodos de ejemplo que utilizan menos restos de detección que el número de analitos seleccionados como diana para la detección se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2013/0079232 A1, a la que se debe hacer referencia adicional.

Los ejemplos de secuenciación pueden utilizar técnicas de pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos a la cadena incipiente (Ronaghi y col. (1996) *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9; Ronaghi, M. (2001) *Genome Res.* 11(1), 3-11; Ronaghi y col. (1998) *Science* 281(5375), 363; patentes estadounidenses n.º 6.210.891; patentes estadounidenses n.º 6.258.568 y la patente estadounidense n.º 6.274.320, a la que se debe hacer referencia adicional). En la pirosecuenciación, el PPi liberado se puede detectar convirtiéndolo en trifosfato de adenosina (ATP) por la ATP sulfurilasa, y el nivel de ATP generado se puede detectar mediante fotones producidos por luciferasa. Los ácidos nucleicos que se van a secuenciar se pueden unir a un patrón de repetición de características en una matriz y se pueden obtener imágenes de la matriz para capturar las señales quimioluminiscentes que se producen debido a la incorporación de nucleótidos en las características de la matriz. Puede obtenerse una imagen después de que la matriz se trate con un tipo de nucleótido (por ejemplo, A, T, C o G). Las imágenes obtenidas después de la adición de cada tipo de nucleótido diferirán con respecto a las casillas de la matriz que se detecten. Estas diferencias en la imagen reflejan el contenido de secuencia diferente de las casillas en la matriz. Sin embargo, las ubicaciones relativas de cada casilla pueden permanecer sin cambios en las imágenes. Las imágenes se pueden analizar usando los sistemas y métodos expuestos en la presente memoria. Por ejemplo, las imágenes obtenidas después del tratamiento de la matriz con cada tipo de nucleótido diferente se pueden manejar de la misma manera que se ilustra en la presente descripción para imágenes obtenidas para métodos de secuenciación basados en terminadores reversibles.

Como se mencionó anteriormente, algunos ejemplos implican la secuenciación mediante técnicas de ligación. Tales técnicas utilizan ADN ligasa para incorporar oligonucleótidos y a continuación se pueden identificar los oligonucleótidos incorporados. Los oligonucleótidos pueden tener normalmente diferentes marcadores que se correlacionan con la identidad de un nucleótido en una secuencia con la que hibridan los oligonucleótidos. Se puede usar una matriz que tiene un patrón de repetición de características a las que se unen ácidos nucleicos diana y se pueden obtener imágenes después del tratamiento de la matriz con los reactivos de secuenciación marcados. Cada imagen mostrará casillas de ácido nucleico que hayan incorporado marcadores de un tipo deseado. En las diferentes imágenes habrá o no diferentes casillas debido al diferente contenido de secuencia de cada casilla, pero la posición relativa de las casillas permanecerá sin cambios en las imágenes. Las imágenes obtenidas a partir de métodos de secuenciación basados en ligamiento se pueden almacenar, procesar y analizar como se expone en la presente memoria. Sistemas y métodos de secuenciación por ligación de ejemplo que pueden utilizarse con los métodos y sistemas descritos en la presente memoria se describen en las patentes estadounidenses n.º 6.969.488, 6.172.218 y 6.306.597, a las que se debe hacer referencia adicional.

Se dirá más sobre la lógica de ejemplo para formar y utilizar los fiduciales después de discutir las formas de fiduciales de ejemplo, colocación, etc. a continuación. Sin embargo, como se ilustra mediante los ejemplos de secuenciación discutidos anteriormente, un método de la presente descripción puede incluir (a) proporcionar un objeto que tiene un patrón de repetición de características en un plano X-Y y un fiducial; (b) obtener una imagen objetivo del objeto usando un aparato de detección, en donde la imagen objetivo incluye el patrón de repetición de características y el fiducial; (c) proporcionar datos a partir de la imagen objetivo a un ordenador, en donde el ordenador tiene datos de referencia, en donde los datos de referencia incluyen coordenadas X-Y para un fiducial del que se ha obtenido imagen; (d) realizar un algoritmo en el ordenador para determinar ubicaciones para las características en la imagen objetivo basándose en la comparación con el fiducial del que se ha obtenido imagen; y (e) repetir las operaciones (b), (c) y (d), en donde el algoritmo determina ubicaciones para las características (por ejemplo, sitios) basándose en los fiduciales detectados.

En los ejemplos de secuenciación, se identifican diferentes contenidos de secuencia de las características (en el método anterior) mediante las diferentes longitudes de onda emitidas desde diferentes etiquetas y detectadas en los diferentes canales del aparato de detección.

Como también ilustran los ejemplos de secuenciación, los datos de imagen procesados incluirán regiones oscuras y claras definidas por píxeles de imagen. Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando se detectan características en una longitud de onda y otras áreas no responden o producen una señal en esa longitud de onda. En el ejemplo de secuenciación, las imágenes obtenidas en diferentes longitudes de onda mostrarán diferentes subconjuntos o grupos de características que responden a la longitud de onda de la radiación usada después.

Se crean múltiples imágenes de matrices con patrón en diferentes longitudes de onda durante el procesamiento, como se discute más adelante, y las características que responden a las diferentes longitudes de onda se pueden detectar, poner en correspondencia exacta, indexar y caracterizar entre sí, por ejemplo usando los fiduciales como puntos de referencia. En imágenes de múltiples canales, por ejemplo, se pueden combinar cuatro imágenes obtenidas para cuatro etiquetas diferentes detectadas en un método de secuenciación para formar una imagen compuesta una vez que se han puesto en correspondencia exacta entre sí. En la práctica, es posible que no se produzcan las imágenes reales, pero datos de imagen, o una parte de los datos de imagen, o información derivada de los datos de imagen (por ejemplo, caracterización de sitio) se pueden comparar después con imágenes adquiridas en otros ciclos del método

de secuenciación. Los datos de imagen adquiridos en estos otros ciclos pueden comprender datos de canales y sitios individuales, de modo que los datos de imagen compuestas se comparan con un solo canal. Alternativamente, los datos de imagen compuestos de un ciclo se pueden comparar con los datos de imagen compuestos de otro ciclo. En algunos ejemplos, estas comparaciones incluyen métodos de puesta en correspondencia exacta que pueden hacer referencia a uno o más de los fiduciales. Por tanto, los datos de imagen compuestos se pueden poner en correspondencia exacta en una imagen de un solo canal o en otros datos de imagen compuestos.

Además, los algoritmos para utilizar los fiduciales, para indexar y para caracterizar moléculas en los sitios de la matriz con patrón permitirán determinar las ubicaciones de sitios, incluyendo, por ejemplo, obtener imágenes de los sitios y fiduciales usando un aparato de detección (por ejemplo, un sistema de imagenología óptico), proporcionando datos de las imágenes resultantes a un ordenador que determina datos de referencia, incluyendo coordenadas X-Y para los fiduciales, y realizando un algoritmo en el ordenador para determinar ubicaciones para los sitios a partir de los datos de imagen en referencia a las ubicaciones de fiduciales. Como se discute anteriormente, en general, se crearán múltiples imágenes, lo que dará como resultado múltiples conjuntos de datos de imagen (para cada ciclo de secuenciación, por ejemplo, y en múltiples longitudes de onda), cada uno de los cuales se pone en correspondencia exacta individualmente mediante referencia a las ubicaciones fiduciales.

De nuevo en este caso, en ejemplos de secuenciación, la secuencia de colores o longitudes de onda de luz (u otras características de señal) detectadas en cada sitio se puede usar para determinar la secuencia de nucleótidos para la especie de ácido nucleico que está presente en el sitio. En muchos casos, los datos de imagen o especies de ácido nucleico se usarán para caracterizar características respectivas a lo largo de una pluralidad de archivos de datos de imagen para determinar una propiedad de las características respectivas en los sitios, tal como una secuencia de ácido nucleico que se infiere a partir de la secuencia de datos de imagen (o más generalmente, las señales detectadas para los sitios).

Como se discute a continuación, los fiduciales pueden incluir marcas de referencia o características que están ubicadas al menos parcialmente en las regiones de la matriz con patrón donde se disponen los sitios, aunque también pueden incluir uno o más marcadores o características de alineación gruesa. Tales marcadores se pueden usar para alinear aproximadamente un dispositivo de detección con la matriz con patrón. Por ejemplo, en ejemplos en los que el detector es un dispositivo de escaneo óptico, la matriz con patrón puede contener uno o más marcadores de alineación gruesa que se usan para alinear aproximadamente la óptica de imagenología con una ubicación de la matriz con patrón. En este caso, los marcadores de alineación gruesa se pueden colocar cerca del borde proximal de la matriz con patrón, estando el borde proximal en o cerca del punto de inicio para el escaneo de la matriz. Los marcadores de alineación gruesa son útiles cuando se escanea una matriz en múltiples franjas. En este caso, los fiduciales pueden diferir a lo largo del eje que es ortogonal a la dirección de escaneo (por ejemplo, los marcadores pueden diferir a lo largo del eje X cuando el escaneo tiene lugar a lo largo del eje Y).

En algunos ejemplos, puede estar presente una matriz de ácido nucleico sobre un sustrato que tiene un patrón de tiras en el borde proximal del sustrato. Se puede usar un escáner óptico para obtener imágenes de la matriz en múltiples franjas. Las tiras funcionan como marcadores de alineación gruesa, mediante lo cual el escáner se orienta con respecto a cada franja basándose en el reconocimiento del patrón de las tiras y el movimiento de la óptica de imagenología (y/o el sustrato de matriz) hasta que las ópticas de imagenología están alineadas con la franja deseada. Cada franja de la matriz incluirá uno o más fiduciales que entonces se usarán en métodos expuestos en la presente memoria como ajuste fino al poner en correspondencia exacta imágenes para su análisis. De esta manera, un sistema de detección puede usar tanto marcadores de alineación gruesa como fiduciales dentro, entre varias o entre dos franjas para localizar características (por ejemplo, sitios) en la matriz.

Como se ejemplificó anteriormente, un aparato de detección que se usa en un método o sistema expuesto en la presente memoria puede incluir un detector de escaneo que escanea a lo largo de la dimensión Y de la matriz, en donde el detector de escaneo escanea franjas paralelas de la matriz. La matriz puede incluir además marcadores de alineación gruesa que distinguen las ubicaciones relativas de las franjas a lo largo de la dimensión X. Cuando se usan, los marcadores de alineación gruesa pueden cooperar con el aparato de detección, tal como para determinar la ubicación de al menos una de las franjas. Opcionalmente, la posición relativa del aparato de detección y/o la matriz se puede ajustar basándose de la ubicación determinada para las franjas. En algunos ejemplos, la determinación de la ubicación de las franjas se puede realizar mediante un algoritmo mediante un procesador u ordenador, tal como el ordenador que realizará la puesta en correspondencia exacta o la identificación de características. Por lo tanto, el sistema puede funcionar para ejecutar el algoritmo en el ordenador para determinar ubicaciones de las características en los datos de imagen, así como para caracterizar moléculas en cada sitio, con referencia basándose en los fiduciales.

Con respecto a implementaciones de ejemplo de las matrices con patrón y celdas de flujo en las que se disponen, se pueden preparar celdas de flujo que tienen un patrón de pocillos llenos de gel, cada pocillo ocupado por una colonia de ADN, como se expone en la patente estadounidense n.º 9.512.422, a la que se debe hacer referencia adicional. Brevemente, se puede fabricar un sustrato de nanopocillos usando litografía de nanoimpresión para producir una matriz hexagonal de pocillos que tiene un diámetro de aproximadamente 400 nm y una profundidad de aproximadamente 300 nm. El espaciado de la matriz puede ser del orden de aproximadamente 700 nm. Un polímero (por ejemplo, poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida o "PAZAM") puede recubrirse sobre el sustrato

y eliminarse mediante pulido como se describe en la patente estadounidense n.º 9.512.422, dejando una matriz de pocillos llenos de gel. El sustrato polimérico con patrón puede entonces injertarse con cebadores como se describe en la patente estadounidense n.º 9.012.022, a la que se debe hacer referencia adicional. Después, los pocillos pueden sembrarse con ADN de ϕ X y las agrupaciones cultivadas como se describe en la patente estadounidense n.º 8.895.249, a la que se debe hacer referencia adicional. La celda de flujo puede secuenciarse en sistemas de secuenciación comercialmente disponibles de Illumina, Inc.

Además, con respecto al análisis en tales sistemas, los datos de imagen pueden analizarse usando el protocolo RTA comercialmente disponible para secuenciadores de Illumina. Los fiduciales se pueden formar y disponer como se discute a continuación, tal como en o parcialmente dentro de franjas de sitios. A la oscuridad (regiones o píxeles que no producen señales) y a la luz (regiones o píxeles que producen señales) se les puede asignar un nivel de intensidad de 0 y 255, respectivamente, o cualquier otro nivel o niveles deseados entre los mismos. Los datos que indican la presencia de un fiducial pueden tener correlación cruzada en posibles desplazamientos X-Y y desplazarse para maximizar la correlación. Se puede ajustar un área, por ejemplo, a una gaussiana bidimensional para determinar un desplazamiento X-Y de subpíxeles que maximice la correlación cruzada. Este proceso se puede repetir en diferentes regiones de la imagen donde se encuentran los fiduciales. Los desplazamientos X-Y de subpíxeles determinados en cada región se pueden usar para determinar una transformada afín que describe cómo aparecen las características de la matriz diseñada en los datos de imagen.

Las figuras 7 a 22 ilustran ejemplos de formas, configuraciones y organizaciones fiduciales que pueden usarse junto con las técnicas anteriores. La figura 7 ilustra una parte de una matriz con patrón, en este caso una esquina 82. En este ejemplo, se forma una alineación gruesa o un fiducial 50 de autocentrado cerca de la esquina 82, y puede ayudar, como ejemplo, a ubicar adecuadamente la(s) franja(s) 48. Otro fiducial 84 se ilustra colocado dentro de la franja 48 en la que se encuentran múltiples sitios 70. De nuevo en este caso, los sitios 70 pueden formarse para unir y localizar moléculas de interés de las que se obtienen imágenes y se caracterizan en un proceso de secuenciación u otro proceso. Se ilustra que un área interior 86 del fiducial 84 incluye sitios 70 en la imagen insertada, mientras que un área exterior 88 comprende otros sitios 70. El fiducial 84 en sí puede ser de un tipo que esté “siempre activo”, lo que significa que a través de todas las fases de obtención de imágenes en diferentes longitudes de onda, el fiducial 84 devuelve una señal. En el ejemplo ilustrado, el fiducial 84 puede comprender perlas 90 u otras características que están dispuestas sobre o en el soporte de la matriz con patrón para formar una forma deseada, tal como un círculo, formas cerradas, formas abiertas, etc., como se discute a continuación.

En un ejemplo, un fiducial del tipo “siempre activo” puede estar formado por perlas que están ubicadas específicamente en el soporte como se ilustra en las figuras 8A-8C. Como se muestra en la figura 8A, se forman pocillos o depresiones 92 en el soporte o sustrato de la matriz con patrón 12. En estos pocillos 92 se pueden disponer perlas 94 u otros soportes moleculares. Durante el uso, las moléculas de interés, como se indica con el número de referencia 96, se anclan a las perlas 94, tal como para análisis, secuenciación, caracterización, etc. Se forman pocillos adicionales 98 en el sustrato o soporte para estructuras más grandes, tal como las perlas 90 que formarán el fiducial. Puede hacerse notar que para configurar tales matrices con patrón 12, puede ser deseable formar los pocillos 98, 92 más grandes y más pequeños y procesar el soporte para la unión de las perlas 90, 94, en donde las perlas más grandes 90 se introducen en los pocillos 98 antes de que las perlas más pequeñas 94 se dispongan en sus pocillos 92. Las perlas 90 serán demasiado grandes para quedar alojadas en los pocillos más pequeños 92 y, por tanto, están situadas en la configuración fiducial deseada definida por los pocillos más grandes 98. En la práctica, los pocillos 98 pueden combinarse para formar una zanja en la que se alojan las perlas 90. En cualquier caso, los pozos o la zanja pueden formarse mediante cualquier proceso adecuado, como grabado iónico o litografía por nanoimpresión. A modo de ejemplo, se pueden autoensamblar microesferas de aproximadamente 0,5 μ m a aproximadamente 10 μ m de diámetro en una zanja antes de la introducción de analitos en la matriz. En algunos casos, puede ser deseable usar matrices unidimensionales de pocillos en lugar de una zanja para mejorar el llenado completo de la forma de fiducial por las esferas y evitar la eliminación de las esferas por fuerzas fluidicas. Además, se puede usar cualquier material adecuado para las perlas o esferas, tal como poliestireno o sílice o combinaciones de los mismos, que se pueden ensamblar en una variedad de patrones llenando zanjas o pozos, como se describe. Materiales tal como esferas coloidales pueden ser útiles para sustratos rígidos (por ejemplo, silicio o vidrio). Durante el autoensamblaje, las esferas que no entran en pozos o zanjas se pueden eliminar mediante una línea de contacto que retrocede (por ejemplo, haciendo fluir aire a través de la superficie) o mediante lavado por flujo.

En otros ejemplos mostrados en las figuras 8B y 8C, las perlas 90 pueden estar situadas sobre el soporte, como en el ejemplo de la figura 8A, pero el material de interés 96, tal como moléculas biológicas, puede ubicarse en ubicaciones sin el uso de perlas o soportes similares. En el ejemplo de la figura 8B, nuevamente en este caso, se forman pocillos 92 y el material 96 se dispone en estos pocillos. En otros ejemplos, el material 96 puede disponerse sobre una superficie superior del soporte sin tales pocillos 92. En el ejemplo de la figura 8C, las perlas 90 pueden ubicarse sobre la superficie del soporte, o bien en ubicaciones deseadas o aleatoriamente. En uso, tales fiduciales aparecerán de nuevo en los datos de imagen, y una vez ubicados en los datos se pueden usar a través de ciclos sucesivos de obtención de imágenes o detección como ayudas de ubicación (es decir, aunque inicialmente no están en ubicaciones conocidas, su ubicación será detectada y posteriormente utilizada como referencia).

Además, aunque en la discusión anterior se ha hecho referencia a esferas o perlas, los elementos que forman los fiduciales “siempre activos” no necesitan ser esféricos. Se pueden usar otras formas, tal como cubos, bloques y formas no esféricas. Además, no es necesario que la forma de fiducial sea similar a un anillo, sino que puede tener cualquier forma deseada, tal como un rectángulo o una cruz. En cuanto al tamaño, de nuevo en este caso se puede usar cualquier tamaño deseado, tal como desde aproximadamente 5 μm hasta aproximadamente 100 μm . El espaciado entre tales elementos puede ser uniforme o no uniforme.

Tales fiduciales, en uso, permiten que se devuelvan señales en todas las fases de la obtención de imágenes. Por ejemplo, las perlas 90, o un recubrimiento proporcionado sobre las perlas, pueden presentar un espectro de absorción y un espectro de emisión que les permita excitarse mediante las diferentes longitudes de onda usadas para obtener imágenes de las perlas del sitio, de modo que, independientemente de la longitud de onda de radiación de excitación, las señales se devuelven desde las perlas más grandes 90. En las imágenes de las figuras 8A-8C, por ejemplo, la radiación de excitación se ilustra mediante flechas 100, mientras que las señales 102, 102' de retorno emanan de las moléculas 96 de interés y el fiducial (por ejemplo, la perla 90). A medida que las diferentes longitudes de onda de radiación 100 se usan durante operaciones secuenciales de obtención de imágenes, algunas de las moléculas 96 devolverán señales 102, dependiendo de las etiquetas usadas durante la operación de obtención de imágenes, mientras que las perlas fiduciales 90 devolverán señales 102' en todas las operaciones de obtención de imágenes, permitiendo la localización de los sitios para la indexación y caracterización molecular independientemente de la longitud de onda de excitación.

En general, tales fiduciales “siempre activos” pueden estar formados por microesferas autofluorescentes. En tales casos, los fiduciales serán observables en ausencia de señales procedentes de la matriz o con patrón para las que los fiduciales están puestos en correspondencia exacta.

Tales fiduciales, y de hecho cualquiera de los fiduciales descritos en la presente discusión, pueden organizarse en una cualquiera de los muchos patrones y relaciones deseados que pueden, por sí mismos, proporcionar información útil y facilitar el procesamiento de datos. La figura 9, por ejemplo, ilustra fiduciales dispuestos en posiciones alternas dentro de franjas de sitios sobre un soporte de matriz con patrón. En este ejemplo, los sitios 104, o franjas 104 de sitios como se ilustran, se proporcionan sobre el soporte de la matriz con patrón 12. Los fiduciales se proporcionan en posiciones alternas en cada fila 106 de sitios o franjas 104. Como se ilustra en este ejemplo, los fiduciales 108 se proporcionan en pares de franjas 104, alternándose con fiduciales 110 proporcionados en otras posiciones dentro de pares adyacentes de franjas 104. Tales disposiciones pueden facilitar la localización de los fiduciales, tal como donde se configuran los fiduciales, como en el caso de los fiduciales “siempre activos” discutidos anteriormente. Mientras que en la figura 9 se muestran dos posiciones alternas, se debe tener en cuenta que se pueden utilizar otros números de posiciones, incluyendo fiduciales que pueden localizarse y distinguirse de otras ubicaciones sobre el soporte en virtud de sus ubicaciones dentro de las franjas, sus ubicaciones con respecto a otros fiduciales, etc.

Otra organización útil de ejemplo para fiduciales según las presentes técnicas se ilustra en la figura 10. En este ejemplo, los fiduciales se disponen en un patrón de repetición regular. En general, tales patrones pueden considerarse patrones teselado que pueden repetirse o no, o que pueden repetirse en dimensiones, posiciones, orientaciones, etc. deseadas, o de manera repetitiva, pero teniendo algunas repeticiones diferentes dimensiones, posiciones, orientaciones, etc. En el ejemplo ilustrado en la figura 10, la matriz con patrón 12 tiene una serie de fiduciales 112 formados en la superficie donde se pueden proporcionar los sitios o franjas (no mostrados en la imagen para mayor claridad). En el ejemplo mostrado en la figura 10, los fiduciales 112 están organizados en un patrón hexagonal que puede formar un hexágono regular o, como se ilustra, un hexágono aplanado 114. También se puede emplear cualquier otro patrón de repetición útil. En el ejemplo ilustrado, los fiduciales 112 a la izquierda comienzan a una distancia deseada 116 del borde izquierdo, mientras que los siguientes fiduciales 112 comienzan a una distancia diferente 118 del mismo borde. De manera similar, una primera aparición de los fiduciales 112 desde el borde superior está a una distancia 120 del borde, mientras que el fiducial 112 más inferior está colocado a una distancia 122 del borde inferior. El fiducial 112 puede colocarse desde el borde más derecho a una distancia 124. En general, las distancias interfiduciales se pueden seleccionar como lo indican los números de referencia 126 y 128 para proporcionar el patrón deseado, así como la posición y orientación del patrón con respecto a ubicaciones de borde conocidas. El patrón puede ubicarse también específicamente con referencia a un tipo diferente de fiducial, tal como el fiducial de esquina discutido anteriormente para un posicionamiento grueso. Esta organización y variaciones en la organización, tal como con respecto a ubicaciones conocidas tal como los bordes, pueden facilitar la determinación de las ubicaciones de los fiduciales y evitar o reducir la probabilidad de errores en la localización de los fiduciales y datos de imagen. Debe tenerse en cuenta que el término “hexágono” puede entenderse de manera más general como algo distinto de una forma regular, incluyendo organizaciones que simplemente están “escalonadas” o desplazadas de otro modo con respecto a un patrón rectilíneo regular.

Debe hacerse notar que el número de fiduciales usados en una matriz se puede seleccionar para mejorar la fiabilidad y robustez en la obtención de imágenes y el análisis de los sitios de una matriz. Por ejemplo, las organizaciones discutidas en este caso podrían usarse con tan solo tres fiduciales, aunque un número mayor permite robustez debido a la probabilidad de que al menos tres fiduciales se detecten de manera fiable en caso de que al menos uno de los fiduciales experimente alguna anomalía en la obtención de imágenes o el reconocimiento (por ejemplo, debido a burbujas, regiones desenfocadas, etc.). El recuento de fiduciales y la precisión de la secuenciación podrían

aumentarse, por ejemplo, utilizando las disposiciones no rectilíneas (por ejemplo, hexagonales) que se discuten en este caso. También puede ser útil organizar los fiduciales para que sean equidistantes con respecto a un punto central porque la distorsión no lineal es radial y esta disposición imparte la misma distorsión en todos los fiduciales. En cuanto al número de fiduciales usados, si se desea un mínimo de 3, por ejemplo, el uso de 4 puede permitir evitar anomalías con 1, mientras que el uso de 6, por ejemplo, permite evitar anomalías con 3.

Las organizaciones discutidas en este caso también pueden abordar un desafío con la inclinación en celdas de flujo con patrón y fiduciales. Por ejemplo, el software y las rutinas usados para determinar la transformación afín para la corrección de datos de ubicación esperan que los fiduciales estén en ubicaciones conocidas. La inclinación dentro de la celda de flujo a lo largo de la longitud de un escaneo puede dar como resultado fiduciales que se muevan desde las áreas esperadas hacia el borde del campo, lo que puede provocar imprecisiones debido a grandes extrapolaciones y distorsión no lineal. Se puede obtener robustez ante una gran inclinación colocando fiduciales sobre toda el área con patrón y cambiando los fiduciales usados basándose en los fiduciales que están más centrados en el campo de visión.

Además, los ejemplos descritos tanto para la forma de cada fiducial (por ejemplo, múltiples formas adyacentes o anidadas) como para su organización tienen el potencial de aumentar la precisión de secuenciación ubicando los fiduciales con mayor precisión, llevando a un menor error de colocación en ubicaciones de agrupación o de sitio, una extracción de intensidad mejorada y lecturas automáticas de nucleótidos más precisas en aplicaciones de secuenciación.

Aún más, en los sistemas de imagenología de “apuntar y disparar”, el área de obtención de imágenes tiende a ser más cuadrada y la distorsión óptica tiende a ser radial. Por tales motivos, organizaciones de fiduciales convencionales pueden no ser ideales porque los fiduciales a diferentes distancias del centro de la imagen pueden tener diferentes cantidades de distorsión óptica. Un diseño que es más apropiado para sistemas de apuntar y disparar puede ser una organización hexagonal como se describe, por ejemplo, en referencia a la figura 10.

Como se mencionó anteriormente, dependiendo de la inclinación de una celda de flujo y del instrumento de secuenciación, es posible que los fiduciales no aparezcan en las ubicaciones esperadas. Esto presenta desafíos para las rutinas de procesamiento para encontrar los fiduciales. Como también se mencionó, si se encuentran, la transformación afín puede no ser precisa si se realiza una extrapolación significativa o si la forma fiducial se ve perturbada por una distorsión óptica no lineal. En tales casos, se puede usar una organización hexagonal con una región en la que un fiducial “central” se encuentra en una posición central o interior dentro del hexágono de fiduciales. Si el sistema de procesamiento es capaz de determinar la inclinación de la celda de flujo (por ejemplo, con respecto a fiduciales de autocentrado), puede cambiar entre los fiduciales específicos usados basándose en esta organización hexagonal o hexagonal modificada (por ejemplo, fiduciales adicionales en la región central).

Otra organización posible para los fiduciales se ilustra en la figura 11. Como se muestra en esta organización de ejemplo, se puede proporcionar una disposición de no repetición de fiduciales 130 (en este caso, de nuevo, los sitios o franjas no se han mostrado en la figura para mayor claridad). En este ejemplo, la matriz 12 tiene varios fiduciales 130 que están colocados sobre o en el soporte y que están ubicados a diferentes distancias entre sí para proporcionar posiciones entre sí y desde características conocidas, tal como los bordes de soporte. A modo de ejemplo, un fiducial superior derecho está situado a distancias 134 y 136 de los bordes que se encuentran en la esquina superior derecha. Un fiducial inferior derecho está colocado a distancias 138 y 140 de los bordes que se encuentran en una esquina inferior derecha. Estos fiduciales están separados entre sí por una distancia 142. Se pueden usar otras distancias interfiduciales 144 entre los diferentes fiduciales 130. Cada fiducial 130, entonces, puede ubicarse a una distancia de una característica conocida, incluyendo los otros fiduciales 130. En este ejemplo, la región 132 representa una matriz subyacente periódica en la que se pueden poner en correspondencia exacta las ubicaciones de cada una de las características, mediante el uso de los fiduciales grandes 130. Las distancias y direcciones de los fiduciales 130 con respecto a estas características conocidas y entre sí pueden catalogarse y usarse para la localización de los fiduciales en datos de imagen, localización de los fiduciales con respecto a sitios, indexación de sitios con respecto a los fiduciales, etc. La organización puede permitir también ubicar uno o más de los fiduciales con respecto a otros fiduciales que están ubicados en los datos de imagen. También debe tenerse en cuenta que en algunas implementaciones, los fiduciales pueden estar ubicados en patrones regulares, estando ubicados algunos fiduciales en ubicaciones de no repetición con respecto a los patrones. Es decir, no todos los fiduciales pueden estar ubicados en el patrón regular, o no todos los fiduciales pueden estar ubicados en una organización de no repetición.

Las figuras 12A-12G ilustran organizaciones de ejemplo para fiduciales que pueden permitir una detección y ubicación mejoradas. En algunos sistemas, se puede lograr precisión y mitigación de algunos modos de error del instrumento de secuenciación mediante el uso de tales organizaciones. En los sistemas de escaneo de líneas, por ejemplo, se pueden realizar cambios de una organización rectangular a una con fiduciales escalonados a lo largo del área de imagen. En sistemas que emplean una plataforma para soportar una celda de flujo, por ejemplo, si la plataforma no escanea adecuadamente al obtener imágenes, pueden perderse fiduciales en una organización rectangular regular. Como se ilustra en la figura 12A, por ejemplo, para un área de imagen de una matriz 12, dos fiduciales 112 en un patrón rectangular P pueden verse afectados negativamente por problemas con la plataforma, haciendo difícil, impreciso o imposible el desarrollo de una transformada afín para la corrección de ubicación de sitios. Sin embargo, en ejemplos que utilizan una organización escalonada P', como se ilustra en la figura 12B, un único fiducial 112 puede

estar ubicado de manera inexacta o inapropiada, pero es más probable que los otros tres fiduciales 112 en el área de imagen permanezcan detectados y ubicados con precisión para su uso en el cálculo de la transformada afín.

En otro ejemplo, mostrado en la figura 12C, el recuento de fiduciales en un área de imagen puede aumentarse para proporcionar robustez mejorada en el caso de que los fiduciales 112 no se puedan usar (tal como debido a la presencia de burbujas o regiones desenfocadas de la imagen y datos resultantes). Esto puede ser útil, por ejemplo, con sistemas de escaneo de líneas. En el ejemplo de la figura 12C, una organización P'' incluye 6 fiduciales 112 en una organización rectangular en el área de imagen. En este caso, hasta 3 fiduciales pueden quedar inutilizables por cualquier motivo, manteniendo al mismo tiempo la capacidad de calcular la transformada afín. De manera similar, combinando los enfoques de las figuras 12B y 12C, la figura 12D ilustra una organización P''' adicional, en la que los 6 fiduciales 112 están presentes en el área de imagen, pero escalonados para proporcionar una mejora adicional.

En sistemas de avance y disparo (a veces llamados "apuntar y disparar"), las áreas de obtención de imágenes tienden a ser más cuadradas (un rectángulo con lados iguales o no muy alargados) y la distorsión óptica tiende a ser radial. Para tales sistemas, puede resultar útil emplear organizaciones que proporcionan fiduciales 112 a una distancia uniforme del centro de una imagen, como se ilustra en la figura 12E. En este ejemplo, se usan más de 4 (por ejemplo, 6) fiduciales 112 en un área de imagen de la matriz 12, tal como en un patrón hexagonal regular 114'. Esta disposición proporciona tanto la robustez de un mayor número de fiduciales en el área de imagen (en el caso de que hasta 3 fiduciales no se puedan usar por cualquier motivo) como también una distancia uniforme desde el centro del área.

Además, dependiendo de la inclinación de la celda de flujo y del instrumento de secuenciación, es posible que los fiduciales no aparezcan en las ubicaciones esperadas. Esto presenta desafíos para el proceso de análisis (por ejemplo, en la localización de los fiduciales). Si se encuentran, la transformada afín basada en las ubicaciones fiduciales puede no ser precisa si se realiza una extrapolación significativa o si la forma fiducial se ve perturbada por una distorsión óptica no lineal. Las figuras 12F y 12G ilustran un ejemplo de una organización fiducial 114'' que puede mejorar la ubicación y el procesamiento en tales situaciones. La organización 114'' se basa en este caso en un patrón hexagonal con un fiducial 112 en el centro del hexágono (aunque se pueden proporcionar hexágonos parciales, o se puede considerar la organización como rectangular con respecto a cada dos filas, con una fila interpuesta en la que fiduciales 112 están ubicados en puntos medios entre fiduciales adyacentes 112 en las filas rectangulares). En un caso en el que la celda de flujo está bien centrada en el instrumento, se puede usar la organización 114'' como se ilustra en la figura 12F, es decir, seleccionando 5 fiduciales 112 en un área de imagen S con uno de los fiduciales 112 generalmente en el centro del área. En el caso de una inclinación (particularmente una inclinación grande) de la celda de flujo en el instrumento, que puede determinarse, por ejemplo, mediante fiduciales de autocentrado cerca de los lados de entrada y salida de la celda de flujo, el sistema puede basar los cálculos en un conjunto reducido de los fiduciales, tal como 4 fiduciales 112 en el área de imagen S', tal como se ilustra en la figura 12G. En cualquier caso, la capacidad de cambiar entre qué fiduciales 112 usar en diferentes casos de inclinación se permite mediante la organización 114'' de las figuras 12F y 12G.

Puede indicarse que una similitud de las organizaciones de las figuras 12B, 12D, 12E, 12F y 12G es que las características fiduciales 112 están dispuestas en filas que están desplazadas una con respecto a otra. En estas filas desplazadas, los fiduciales 112 de una primera fila no se alinean con los fiduciales de una fila adyacente a lo largo de una línea perpendicular a las filas primera y segunda. El patrón resultante puede ser triangular, hexagonal o incluso irregular.

Con respecto a las organizaciones discutidas anteriormente, puede indicarse que en algunos sistemas de secuenciación, la fabricación del soporte y la matriz (por ejemplo, la celda de flujo), la obtención de imágenes de los sitios y el procesamiento de datos imagen pueden basarse en una periodicidad que coincide con el teselado y la costura que se realiza en los datos de imagen (por ejemplo, para áreas de imagen adyacentes). Se puede invertir un esfuerzo significativo para garantizar la alineación de ciertas características, tal como los carriles de los sitios con una capa interpuesta del soporte. Usando una de las organizaciones discutidas anteriormente, se pueden considerar patrones más estrictos, con suficiente densidad fiducial que permita tener siempre suficientes fiduciales para la ubicación adecuada y la corrección de errores de ubicación libres de problemas de periodicidad, o que son al menos mucho más robustas que las organizaciones actuales incluso si algunos fiduciales no son fiables por algún motivo. Además, en tecnologías existentes, para teselas de las que se obtienen imágenes, si no se sabe dónde esperar los fiduciales, puede llevar mucho tiempo ubicarlos solo mediante análisis de imágenes. En organizaciones en las que los fiduciales están aproximadamente en las mismas ubicaciones de tesela a tesela (suponiendo que la celda de flujo está bien diseñada, ensamblada y alineada), esto es un problema menor. Sin embargo, para determinados enfoques de organización, tal como los que se describen en este caso, que pueden incluir diferentes periodicidades, o donde los fiduciales se distribuyen continuamente para permitir tolerancias reducidas en la alineación entre superficies de la celda de flujo, pueden calcularse previamente posiciones para todos los fiduciales en la celda de flujo en relación con una puesta en correspondencia exacta global realizada antes de que comience la secuenciación (por ejemplo, localizando cruces fiduciales de autocentrado). Entonces, aunque la tesela de la que se han obtenido imágenes puede producir diferentes ubicaciones de fiduciales de tesela a tesela (por ejemplo, debido a capas escasamente alineadas de la celda de flujo), las ubicaciones esperadas de los fiduciales se pueden conocer a priori, y el procesamiento de imágenes de cada tesela puede basarse en una lista de coordenadas esperadas para los fiduciales de cada tesela. Esto funciona como un proceso de alineación gruesa en el que el algoritmo de puesta en correspondencia exacta

fiducial real proporciona una alineación más fina de cada tesela. Para los casos en los que los fiduciales están realmente en una distribución aleatoria, puede no ser posible conocer a priori su ubicación y la puesta en correspondencia exacta es similar a la de celdas de flujo con patrón aleatorio (por ejemplo, ejecutar varios ciclos de secuenciación y obtención de imágenes, correlacionar de forma cruzada las imágenes con extraer ubicaciones de los fiduciales en cada tesela y, para los ciclos posteriores, proporcionar las coordenadas determinadas a cada tesela).

Además de las características y organizaciones de respuesta de señal anteriores, los fiduciales pueden formarse de maneras que permitan distintas ventajas sobre las configuraciones convencionales. Además, debe hacerse notar, a través de la presente discusión, que estos aspectos de las técnicas no son mutuamente excluyentes. Es decir, las formas y configuraciones que se discuten a continuación se pueden usar unas con otras, con tecnologías “siempre activas”, en organizaciones útiles deseadas, etc.

Una primera configuración para un fiducial potencialmente útil se ilustra en la figura 13. En este ejemplo, la matriz 12 tiene un fiducial 146 de forma abierta o no cerrada. El fiducial 146 puede tener propiedades o características deseadas, tal como un grosor o anchura 148, un segmento 150 parcialmente no cerrado y al menos una abertura 152. La forma usada para el fiducial 146 puede ser circular, como se muestra en este ejemplo, o puede tener cualquier otra forma deseada (por ejemplo, elíptica, en forma de caja, etc.). En general, la configuración “no cerrada” significa que la forma tiene al menos una porción que se extiende más de 180° para al menos comenzar a encerrar una región que puede considerarse una región “interior”. Se pueden prever muchas de estas formas, a diferencia de las formas abiertas que no comienzan a encerrar una región interior, o formas completamente cerradas que no incluyen la abertura 152.

Otra configuración de ejemplo para un fiducial útil potencial se ilustra en la figura 14. En este caso, el fiducial 154 tiene segmentos que forman una barrera parcial y que encierran parcialmente una región interior. En este sentido, el fiducial 154 de la figura 14 puede considerarse un caso especial de la forma no cerrada discutida anteriormente. Se ha hecho notar, sin embargo, que es la combinación de los segmentos la que encierra parcialmente la región interior. En el caso de la figura 14, se proporcionan cuatro de tales segmentos, incluyendo segmentos 156, 158, 160 y 162. Estos segmentos 156, 158, 160 y 162 están separados entre sí por las aberturas 164, 166, 168 y 170. En este caso, los segmentos 156, 158, 160 y 162, aunque separados, forman un fiducial circular, aunque se puede usar cualquier forma deseada. Además de los beneficios de la forma no cerrada, las aberturas 164, 166, 168 y 170 en el fiducial 154 de la figura 14 pueden permitir mejoras en la fabricación de la matriz con patrón. En algunas técnicas de fabricación, como la litografía de impresión, se pueden formar burbujas en el material impreso, tal como dentro o cerca de los fiduciales. El uso de disposiciones no cerradas para los fiduciales puede permitir el escape de tales burbujas (indicadas por los círculos discontinuos 172 en la figura) o evitar por completo la formación de tales burbujas.

La figura 15 ilustra un ejemplo adicional de un fiducial 174 que comprende una serie de formas no cerradas. Las formas son circulares, como anteriormente, aunque se puede usar cualquier forma deseada. Cada una de las formas comprende segmentos 178 separados por aberturas 180. En el ejemplo de la figura 15, las formas son círculos concéntricos, aunque no es necesario que las formas sean estrictamente concéntricas, sino que pueden estar desplazadas entre sí como se analiza a continuación. Además, las aberturas 180 proporcionadas en cada una de las formas pueden ser suficientes para permitir el paso de burbujas y constituyentes transportados por fluido como se discutió anteriormente. Debe apreciarse que el grosor o anchura de los segmentos 178, el espaciado entre los segmentos 178 de cada forma y el espaciado entre formas adyacentes pueden seleccionarse para permitir que el fiducial 174 se identifique, localice o transmita información más fácilmente en virtud de la configuración que se discute más detalladamente a continuación.

La figura 16 ilustra un ejemplo adicional para un fiducial 181 que comprende una serie de puntos 182. Nuevamente en este caso, esto puede considerarse un caso especial de una forma no cerrada y puede facilitar la fabricación, utilizar menos área de superficie de la matriz 12 o proporcionar otros beneficios, mientras se permite el paso de burbujas o constituyentes transportados por fluido.

Como se ha hecho notar, se contempla que algunos ejemplos de fiduciales pueden codificar o proporcionar información que puede ser útil de muchas maneras diferentes. La codificación de tales datos se proporciona mediante la selección de parámetros o propiedades del fiducial que son evidentes en los datos de imagen (por ejemplo, mediante la distinción entre regiones claras y oscuras en los datos de imagen). Nuevamente en este caso, tales fiduciales pueden ser del tipo “siempre activos” de modo que esta información se transmite en todas las imágenes producidas. Se han discutido algunos parámetros que pueden usarse para la codificación de datos para los fiduciales descritos anteriormente (por ejemplo, anchura o grosor, tamaño y forma, distancia entre un número de formas, etc.). Otros pueden resultar evidentes a partir de los fiduciales de las siguientes figuras. La figura 17 ilustra un fiducial 183 que no tiene forma cerrada y que comprende segmentos 184 separados por aberturas 186. Nuevamente en este caso, el grosor o anchura de cada segmento 184 se puede ajustar para mejorar la detección o proporcionar información. Se puede usar más de una de tales formas, y estas pueden ser concéntricas o no concéntricas. En el ejemplo de la figura 17, los segmentos 184 están dispuestos uno al lado de otro y son diferentes en longitud o extensión alrededor de al menos una parte del fiducial como se indica con el número de referencia 188. La extensión de los segmentos 184 y los espaciados entre los segmentos se pueden seleccionar para proporcionar información según una técnica de codificación estándar y bien entendida. La información proporcionada por el fiducial 183 puede incluir cualquier dato útil, tal como identificación del fiducial, identificación de una ubicación del fiducial, indicaciones de dónde ubicar otros

fiduciales, identificación de la matriz, identificación de una persona o sujeto que proporciona muestras biológicas para la matriz, fabricantes, lotes de fabricación o cualquier otra información útil.

La figura 18 ilustra un ejemplo adicional para un fiducial 185, que en este caso comprende dos formas que no son concéntricas entre sí. Debe tenerse en cuenta que esta configuración, o variaciones de esta configuración, se pueden usar con cualquiera de las otras técnicas descritas, tal como para fiduciales "siempre activos", formas cerradas o no cerradas, segmentos que proporcionan datos, segmentos y aberturas que permiten el flujo de fluidos, etc. Además, se puede usar cualquier forma deseada, siendo las formas circulares mostradas solo una posibilidad. En el ejemplo de la figura 18, las formas no son concéntricas. La forma exterior 190 es un anillo que rodea al menos parcialmente una forma o anillo interior 192. La forma exterior 190 comprende segmentos 194 separados entre sí por aberturas, mientras que la forma interior 192 también comprende segmentos 196 separados por aberturas. La forma exterior 190 tiene un centro 198 que está desplazado con respecto al centro 200 de la forma interior 192. Actualmente se contempla que, de nuevo, las formas no cerradas pueden permitir el paso de fluidos, al tiempo que presentan el potencial de codificar información en virtud de los parámetros físicos que caracterizan las formas, su relación entre sí y, en este caso, el desplazamiento entre sus centros 198, 200. Por ejemplo, el desplazamiento puede facilitar la identificación del fiducial 185, la determinación de su ubicación en la matriz 12, la determinación de la ubicación de otros fiduciales o características, etc.

Las figuras 19A-19D ilustran un ejemplo adicional para un fiducial 226 que puede facilitar este tipo de transmisión de información, tal como localización de características. En este ejemplo, un fiducial 226 comprende una característica más grande 228 y una característica más pequeña 230. En este caso, la característica más pequeña 230 está ubicada dentro de la característica más grande 228 y, en este ejemplo, ambas son estructuras de tipo anillo. En este ejemplo, las características o formas son adyacentes y están anidadas. Como anteriormente, tales estructuras pueden tener formas cerradas, formas no cerradas, estructuras "siempre activas" o pueden utilizar cualquiera de las otras configuraciones descritas en la presente memoria. En el ejemplo de la figura 19A, un espacio interior 232 está rodeado al menos parcialmente por la característica más grande 228 y tiene un centro 234. Un centro 236 de la característica más pequeña 230 está desplazado con respecto al centro 234 por una distancia 238. Además, una proyección a través de los dos centros 234, 236 define un ángulo 240 con respecto a una orientación conocida que, en el ejemplo ilustrado, es la línea discontinua vertical. Tales fiduciales 226 pueden ser útiles para transmitir información, tal como su ubicación en una matriz 12, su ubicación con respecto a bordes (de la matriz o de una o más franjas), la ubicación de otras características (incluyendo otros fiduciales), la dirección de tales características (por ejemplo, en virtud del ángulo de la proyección), la distancia a características (incluyendo fiduciales) en virtud de la distancia del desplazamiento, etc.

El ejemplo de la figura 19B es una disposición adyacente y anidada similar a la que se muestra en la figura 19A, pero en este caso la característica más grande 228 y la característica más pequeña 230 se superponen. Este solapamiento puede facilitar la localización del fiducial 226', la determinación de la orientación o dirección del desplazamiento, etc. La región 242 de superposición en este caso está alineada con el ángulo de desplazamiento, estando definida la cantidad de desplazamiento 244 por los tamaños relativos de las características 228, 230.

En el ejemplo del fiducial 226" mostrado en la figura 19C, una disposición adyacente y anidada similar incluye una característica más grande 228 y una característica más pequeña 230. En este caso, el espacio interior 232 de la característica más grande 228 incluye solo una porción de la característica más pequeña 230, que se extiende fuera de la característica más grande 228 para formar regiones superpuestas 246. Nuevamente en este caso se proporciona un desplazamiento 248, que puede ayudar a identificar las características 228, 230, identificar la ubicación o proporcionar información sobre ubicaciones y distancias a otras características en la matriz 12. Debe hacerse notar que las disposiciones del tipo mostrado en la figura 19C pueden comprender características de tamaño diferente, o las características pueden ser del mismo tamaño, pero con centros desplazados 234, 236 y con orientaciones angulares deseadas.

En el ejemplo de la figura 19D, el fiducial 226''' comprende una primera característica más grande 228 y una característica más pequeña 230, en este caso ambos círculos (aunque de nuevo se podrían usar otras formas). Las dos características 228, 230 son adyacentes y están desplazadas entre sí, pero en este ejemplo no se superponen. Como en los ejemplos anteriores, cada característica 228, 230 puede tener un centro 234 y 236 que puede usarse como referencia para una dirección. Es decir, como en los ejemplos precedentes, una proyección a través de los dos centros 23, 236 define un ángulo 240 con respecto a una orientación conocida que, en el ejemplo ilustrado, es la línea discontinua vertical. Tales fiduciales 226' pueden ser útiles para transmitir información tal como su ubicación en una matriz 12, su ubicación con respecto a bordes (de la matriz o de una o más franjas), la ubicación de otras características (incluyendo fiduciales), la dirección de tales características, la distancia a características (incluyendo los fiduciales), etc. Puede hacerse notar que, aparte de las disposiciones "anidadas", aunque se hace referencia a características "más grandes" y "más pequeñas", cuando las características no están "anidadas", pueden tener el mismo tamaño.

Las disposiciones de fiduciales anteriores pueden tener una serie de ventajas. Por ejemplo, los anillos o características desplazados o desviados pueden definir un vector, cuya dirección conecta los centros de los anillos o características y codifica una orientación deseada del sustrato (o cualquier otra dirección útil). Codificar la orientación del sustrato de esta manera puede simplificar la fabricación de celdas de flujo porque se puede hacer que la puesta en correspondencia exacta de imágenes sea tolerante a la inclinación incluso cuando solo se obtienen imágenes de 1 o

2 fiduciales. Por lo tanto, las tolerancias de fabricación en la alineación de las diferentes capas de la celda de flujo durante el montaje, y en la alineación de la celda de flujo con el secuenciador, podrían relajarse considerablemente. En estos ejemplos, ambos anillos permanecen invariantes en rotación (es decir, el núcleo se superpondrá con la imagen independientemente de la orientación del sustrato). Entonces el “centro” del fiducial puede referirse al centro del anillo exterior. La dirección se calcula hallando el ángulo vectorial entre los centros de los anillos exterior e interior, como se mencionó.

Además, ejemplos de fiduciales que codifican directamente información pueden tener una variedad de formas y configuraciones, tal como las que se muestran en el ejemplo de las figuras 20A-20C. Los fiduciales 250, 250' ilustrados pueden comprender una característica más grande 252 y una característica más pequeña 254. Dentro de cada una de estas características 252, 254, en el ejemplo ilustrado, la información puede codificarse de formas novedosas. Por ejemplo, en el enfoque ilustrado se proporcionan tres conjuntos redundantes de puntos, incluyendo un primer conjunto 256 formado por una matriz de puntos 258 en la característica más pequeña 254, con conjuntos redundantes similares de puntos 260 y 262 en la característica más grande 252 fuera de la característica más pequeña 254. En la práctica, se puede emplear tan solo una (única) matriz codificada, y la técnica para codificar puede adoptar cualquier forma deseada, incluyendo puntos, áreas, regiones relativas de luz y oscuridad en las imágenes, etc. En todos los casos, tal codificación puede ser legible por máquina.

Tal codificación directa puede emplear tecnologías binarias digitales en donde las regiones codifican datos basándose en si devuelven una señal (por ejemplo, aparecen brillantes en los datos de imagen) o no devuelven una señal (por ejemplo, aparecen oscuros en los datos de imagen). Una región oscura donde se podría esperar una señal puede representar un “0”, mientras que una región que produce una señal puede representar un “1”. Por supuesto, los valores o la codificación pueden determinarse basándose en la ubicación dentro de la matriz, la orientación, el tamaño, etc. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que tales matrices pueden definirse para codificar números, valores alfanuméricos, valores hexadecimales, etc. Los datos subyacentes codificados pueden ser representativos de cualquier información deseada, tal como identificación del fiducial, identificación de la matriz, identificación de una franja o ubicación en la matriz, identificación de ubicaciones o direcciones de otras características, identificación de sujetos o individuos (por ejemplo, quién proporcionó muestras para la realización de pruebas), identificación de un fabricante o detalles de fabricación, fechas, instituciones, etc.

Actualmente se contempla que el uso de características redundantes de este tipo puede mejorar la robustez de la identificación. Por ejemplo, como se muestra en la figura 20B, los tres conjuntos de puntos 256, 260, 262 de la figura 20B pueden, durante la obtención de imágenes, no corresponderse exactamente entre sí. Es decir, a pesar de tener la misma forma o intención, por diversas razones algunos de los puntos pueden aparecer cuando no se desean, o pueden no aparecer donde se desea. Los algoritmos para leer, interpretar y comparar los datos descodificados pueden proporcionar identificación y salida de datos en tales casos basándose en la redundancia.

La figura 20C ilustra un ejemplo de una matriz de puntos 258 para codificar directamente información en un fiducial de este tipo. La matriz (o conjunto) 256 comprende puntos 258 dispuestos en un patrón 264 conocido. Los puntos 258 pueden estar poblados con perlas u otros materiales que responden o no a longitudes de onda de radiación utilizada en la obtención de imágenes. En algunos casos, puede ser deseable utilizar materiales que tengan espectros de absorción y emisión que se superpongan con las diferentes longitudes de onda de radiación usadas en la obtención de imágenes de modo que la matriz/conjunto 256 esté “siempre activo”. En el ejemplo ilustrado, los puntos 266 se pueblan para devolver señales, mientras que puntos 268, en otras ubicaciones, que podrían poblarse no se pueblan o se pueblan con un material que selectivamente no devuelve una señal. La matriz resultante, después, devolverá señales colectivas que codifican los datos deseados directamente. Nuevamente en este caso, los datos codificados pueden ser legibles por máquina.

En la práctica, tales ejemplos pueden presentar codificación mediante esquemas deseados. Por ejemplo, cada “1” está representado por un micropocillo grande que produce una señal o aparece “blanco” en los datos de imagen. Cada “0” está representado por la ausencia de un micropocillo. En el ejemplo ilustrado en la figura 20C, el número cuatrocientos ochenta y siete (487) puede expresarse como un número binario de 10 bits y después codificarse en los 10 micropocillos posibles (puntos 264). Los micropocillos blancos (por ejemplo, puntos 258) pueden tener un patrón físico (y agruparse), mientras que los pocillos negros (por ejemplo, los puntos 268, ilustrados en contornos discontinuos) pueden no tener un patrón físico (pueden permanecer a ras con el área intersticial). De esta manera, solo los unos pueden agruparse y, por lo tanto, verse en un secuenciador. En el ejemplo ilustrado, la organización del número binario es de izquierda a derecha y de arriba abajo. La codificación binaria puede resultar útil. Por ejemplo, no hay ambigüedad para cada valor. Está completamente oscuro o tiene alguna región de fluorescencia. Se usa una organización hexagonal para empaquetar los bits estrechamente juntos en el ejemplo ilustrado de modo que ocupen menos espacio, porque no contribuyen al área de superficie secuenciable, por lo que su área total debe minimizarse. Además, la codificación binaria no requiere necesariamente un reconocimiento de imágenes sofisticado. Una vez ubicado el fiducial y determinada su orientación, cada pocillo del código binario se puede ubicar superponiendo una tabla precalculada de valores de ubicación para cada uno de los 10 micropocillos posibles en el código (en este ejemplo). Esta ubicación sencilla sin reconocimiento de imágenes es posible gracias a la información direccional descrita anteriormente.

En última instancia, es posible cualquier tipo de disposición, forma o número de bits. En el ejemplo ilustrado, los bits se eligieron para que fueran sustancialmente más grandes que los pocillos individuales de modo que no se confundan con sitios y tengan suficiente policlinalidad para que cierta parte de cada bit se ilumine en cada canal de color (por ejemplo, "siempre activo"). Puede hacerse notar en este caso que el uso de policlinalidad puede tener uno o más inconvenientes. Por ejemplo, cada uno de los micropocillos estará solo parcialmente poblado (~ 25 % de ocupación) y, por lo tanto, se pueden introducir errores en el valor descodificado porque uno o más de los micropocillos pueden tener muy poca ocupación en cualquier canal para registrarse correctamente como un "1". O bien, un área que debería ser cero puede estar contaminada (o tener una superficie rugosa que puede atrapar fluoróforos) y aun así devolver una señal durante la obtención de imágenes, a pesar de no tener un micropocillo. Estos se conocen comúnmente como errores de inversión de bits.

Se pueden ofrecer varias soluciones para tales desafíos. Por ejemplo, las intensidades de todos los canales de color se pueden sumar para crear una imagen compuesta. En este caso, la probabilidad de cambios de bits debido a la policlinalidad puede reducirse considerablemente (pero no eliminarse por completo: todavía existe la posibilidad de que, debido a errores de agrupamiento o imperfecciones de fabricación, un micropocillo no se agrupe lo suficiente como para aparecer lo suficientemente brillante en cualquier canal de color).

En otra solución, se puede introducir corrección de errores, tal como mediante redundancia. En el ejemplo ilustrado, por ejemplo, el código binario físico se repite tres veces, de manera idéntica, en el fiducial (se pueden colocar en cualquier lugar, con cualquier orientación conocida entre sí y con el fiducial). En el ejemplo ilustrado, para simular errores, los pocillos se oscurecieron aleatoriamente con una probabilidad del 10 % (el valor real de esta tasa de error dictará cuántas veces puede ser deseable repetir el código para capturar errores). Se puede esperar que este sea un tipo de error común. En este ejemplo, los pocillos también se poblaron aleatoriamente en el fondo (con el 25 % de los pocillos seleccionados aleatoriamente para que fueran brillantes; esto simula un canal de un solo color en un sistema de secuenciación de 4 canales). Después, se usaron dos núcleos para cada uno de los anillos para encontrar los dos centros y la orientación del fiducial. Esto simula cómo, después de obtener imágenes, se puede encontrar el centro y la orientación del fiducial. A continuación, conociendo las posiciones de todos los bits físicos con respecto al fiducial, se pueden muestrear los píxeles de datos de imagen para determinar el valor del bit. En general, se puede muestrear un número predeterminado de píxeles agrupados alrededor de los centros de cada bit físico (el área cubierta por los píxeles muestreados debe coincidir con el área del bit para obtener la mayor cantidad de señal posible de cada bit). Si la intensidad agregada de los píxeles para cada bit físico superó un valor umbral predeterminado, puede registrarse como un "1", en caso contrario, como un "0". Una vez que los tres bits físicos se han identificado como 1 o 0, cada uno de los tres códigos se ensambló en su número binario correspondiente.

En el ejemplo ilustrado, los errores dieron como resultado tres valores diferentes descodificados para cada código: 391, 487 y 230. Finalmente, una operación binaria OR realizada entre los tres números puede permitir la recuperación del número codificado originalmente. Este esquema de corrección de errores de triple redundancia puede corregir hasta dos errores de inversión de bits, donde el bit que debería ser un 1 se registra como un 0 (es decir, un pocillo que debería ser brillante, no era lo suficientemente brillante y se confunde con oscuro). Para corregir más de dos, se podrá añadir una redundancia cuádruple o superior.

La codificación de datos por características de los fiduciales se puede usar, por ejemplo, para coser múltiples imágenes o para etiquetar diferentes áreas de una celda de flujo que tienen patrón con diferentes condiciones (por ejemplo, químicas diferentes, organizaciones de pocillos diferentes, etc.). Para codificar información de posición, por ejemplo, se puede usar un código binario de 10 bits con patrón físico para cada fiducial como se discutió anteriormente. En la celda de flujo, cada micropocillo puede agruparse y emitir fluorescencia en todos los canales del secuenciador. Este código binario se puede repetir varias veces dentro o cerca del fiducial (en el caso ilustrado, 3 veces) para facilitar la corrección de errores.

Aún otras técnicas para crear fiduciales tanto para la alineación gruesa como para la puesta en correspondencia exacta de sitios y otras características pueden depender de la radiación reflejada en lugar de la emisión resultante de la excitación. Algunos de estos fiduciales también pueden codificar información. Las figuras 21A y 21B ilustran un primer ejemplo de tales fiduciales. En el ejemplo de la figura 21A, se proporciona un fiducial 270 en una superficie de una matriz 12. El fiducial 270 se puede depositar sobre el soporte, tal como mediante impresión, grabado, deposición de vapor o mediante cualquier otra técnica adecuada. En tales casos, el fiducial 270 puede estar hecho de un material, tal como un metal, semiconductor u otro material al menos parcialmente reflectante que refleje la luz en longitudes de onda utilizadas durante el procesamiento, tal como durante la obtención de imágenes. La luz incidente 272 puede originarse a partir de la óptica del sistema 18 de imagenología (figura 1), y luz reflejada 274 puede detectarse y utilizarse, tal como, por ejemplo, para alinear la matriz 12 en el sistema 28 de imagenología, para proporcionar datos codificados como se discutió anteriormente, o para cualquier otro fin útil. Además, en este ejemplo y como se muestra en la figura 21B, el fiducial 270 está fijado o dispuesto sobre la superficie 280 de la matriz 12 en lugar de dentro del cuerpo 276 del soporte.

En otros ejemplos, tal como se ilustra en las figuras 22A y 22B, se pueden formar fiduciales 270 que comprenden características reflectantes o refractivas en la superficie 280, o dentro o parcialmente dentro del cuerpo 276 del soporte de matriz. En los ejemplos mostrados en las figuras 22A y 22B, por ejemplo, los fiduciales 270 comprenden valles o

crestas 282 o 284 que pueden definir datos o información que pueden interpretarse, tales como rejillas de Bragg. Dichas rejillas pueden responder a longitudes de onda específicas (o equivalentemente a frecuencias) de luz incidente 272, y devolver la luz reflejada o refractada 274 que es detectada por la óptica del sistema e interpretada.

5 Como se discute a lo largo de la descripción anterior, la configuración, formación, organización y uso novedosos de los fiduciales pueden hacer que el procesamiento de matrices con patrón sea más efectivo, eficiente o significativo. Un lógica de ejemplo para utilizar los fiduciales se ilustra en la figura 23. La lógica, indicada por el número de referencia 300, puede comenzar mediante referencia a la alineación gruesa o autocentrado de fiduciales como se indica en la referencia 302. Como se discutió anteriormente, la matriz con patrón se puede preparar por adelantado obteniendo 10 muestras o una biblioteca de moléculas que se van a caracterizar, disponiéndolas o uniéndolas en sitios en la matriz con patrón, mejorando la detectabilidad de las moléculas (por ejemplo, mediante amplificación), preparando una celda de flujo para procesamiento, e instalando la celda de flujo en un sistema de imagenología, tal como para secuenciación. El bloque 302, entonces, puede implicar la detección de uno o más fiduciales que ayudan a ubicar y orientar adecuadamente la celda de flujo y la matriz con respecto al sistema de imagenología, y la óptica y la etapa de traslación 15 usadas para obtener progresivamente datos de imagen. Los fiduciales de autocentrado pueden comprender cualquiera de las formas y organizaciones discutidas anteriormente, pero a menudo incluirán fiduciales que se encuentran fuera de las regiones de sitios o franjas de sitios.

Se hace referencia a los fiduciales de autocentrado durante el montaje, alineación y ubicación de la matriz con patrón 20 como se indica en 304 en la figura 23. Después de eso, se puede realizar la secuenciación y la obtención de imágenes como se indica en el bloque 306. Para muchas aplicaciones, este procedimiento puede incluir múltiples operaciones que pueden repetirse cíclicamente, tal como para obtener información de secuencia a partir de moldes o analitos que comprenden múltiples bases de ADN (u otras moléculas). En la lógica de ejemplo de la figura 23, por ejemplo, este proceso procede mediante la introducción de la química usada para unir y etiquetar moléculas en los sitios poblados 25 como se indica en 308, lo que da como resultado que estas moléculas se unan y se etiqueten como se indica en 310, para facilitar la detección de las moléculas individuales que devolverán señales en el ciclo actual del proceso. En 312, la celda de flujo puede lavarse para eliminar la química restante. Entonces, en 314, se pueden obtener imágenes de los sitios a una longitud de onda deseada como se discutió anteriormente. La obtención de imágenes puede producir datos de imagen que se procesan y almacenan inmediatamente (o posteriormente), como se indica en 316. Tal 30 procesamiento puede incluir la detección de señales devueltas desde los sitios en virtud de las moléculas etiqueta, la indexación de los sitios, el mantenimiento o el desechado de cualquier dato que sea útil o no, etc. En 318, se determina si se debe usar otra longitud de onda de radiación para un ciclo adicional de obtención de imágenes y, como se indica en 320, si se desean una o más imágenes de otras longitudes de onda, el proceso regresa a 314 para tal obtención de imágenes. Una vez que se completa este ciclo de obtención de imágenes, se puede determinar en 322 si se han 35 completado todas las obtenciones de imágenes y secuenciación deseadas. De lo contrario, se puede implementar un proceso 324 de desbloqueo y lavado e introducir nueva química para completar un ciclo adicional de secuenciación e imágenes regresando a 308. Una vez que se hayan completado todos los ciclos deseados, el sistema puede proceder al procesamiento de datos.

40 El procesamiento de los datos de imagen, almacenados en uno o más circuitos de memoria, puede realizarse de forma local o remota. Además, el procesamiento de los datos puede realizarse mediante el mismo sistema, o mediante otro sistema, accediendo a los datos de imagen almacenados o a los datos derivados de los datos de imagen (por ejemplo, una lista indexada de sitios que devolvieron señales durante la obtención de imágenes sucesivas). Este procesamiento puede proceder mediante identificación y localización de cualquier fiducial que pueda detectarse a partir de los datos 45 de imagen, como se indica en 326. Para este fin, se puede acceder a los datos de imagen, o a los datos derivados de los datos de imagen, como se indica en el paso 328, que nuevamente se puede realizar local o remotamente. Los fiduciales pueden identificarse, ubicarse e interpretarse mediante cualquiera de las técnicas discutidas anteriormente, tal como, por ejemplo, dependiendo de su configuración, forma, organización y cualquier información que puedan codificar. En este punto, parte de la información que puede estar codificada por los fiduciales puede ser descodificada 50 como se indica mediante la referencia 330. Tal información puede incluir, por ejemplo, la ubicación del fiducial, la identificación del fiducial, la determinación de la ubicación de otras características (incluyendo otros fiduciales), la identificación de la matriz o cualquier información relacionada con la matriz, etc.

A continuación, en 332, los datos de imagen, incluyendo datos indicativos de los sitios que devuelven señales, las 55 señales específicas devueltas (por ejemplo, en qué longitudes de onda o frecuencias) y sus ubicaciones pueden indexarse y procesarse. Nuevamente en este caso, esto puede implicar acceder a los datos de imagen o a los datos derivados de los datos de imagen, como se indica en 334. Este acceso se representa en la figura como repetido en la medida en que 332 puede realizarse al mismo tiempo que 326, o en algún momento o ubicación posterior. El proceso realizado en 332 puede incluir la puesta en correspondencia exacta de imágenes o sitios o fiduciales detectados a 60 partir de los datos de imagen, y descodificación adicional de información de fiducial, etc.

A continuación, en 338, se pueden caracterizar moléculas en sitios que devuelven o no señales en etapas específicas de la formación de imágenes cíclicas (tal como por referencia a las señales devueltas). Esto también puede incluir 65 acceder a datos de imagen, o datos derivados de los datos de imagen, como se indica en 340. Además, este proceso puede incluir ensamblar lógicamente secuencias de moléculas en los sitios individuales y ensamblar segmentos de moléculas de diferentes sitios para obtener secuencias más largas. De nuevo en este caso, este proceso puede incluir

descodificar información adicional procedente de los fiduciales en 342, tal como la identificación de un sujeto (por ejemplo, un donante de la muestra), la identificación de una fecha o institución para la cual se realizó el proceso, etc.

- 5 Debe apreciarse que a la terminología empleada explícitamente en la presente memoria que también puede aparecer en cualquier descripción a la que se hace referencia debería otorgarse un significado muy en consonancia con los conceptos específicos descritos en la presente memoria.

- 10 Los términos “sustancialmente” y “aproximadamente” usados a lo largo de esta descripción, incluyendo las reivindicaciones, se usan para describir y considerar pequeñas fluctuaciones, tales como las debidas a variaciones en el procesamiento. Por ejemplo, pueden referirse a menor o igual al $\pm 5\%$, tal como menor o igual al $\pm 2\%$, tal como menor o igual al $\pm 1\%$, tal como menor o igual al $\pm 0,5\%$, tal como menor o igual al $\pm 0,2\%$, tal como menor o igual al $\pm 0,1\%$, tal como menor o igual al $\pm 0,05\%$.

- 15 En esta descripción, incluyendo las reivindicaciones, todas las frases de transición tal como “que comprende”, “que incluye”, “que porta”, “que tiene”, “que contiene”, “que implica”, “que sostiene”, “que se compone de” y similares deben entenderse como abiertas, es decir, que significan que incluyen aunque no de forma limitativa. Únicamente las expresiones transicionales “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” deberán ser expresiones transicionales cerradas o semicerradas, respectivamente.

- 20 Si bien se han descrito en detalle varios ejemplos, debe entenderse que los ejemplos descritos pueden modificarse. Por lo tanto, la descripción anterior debe considerarse no limitativa.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de análisis configurado para realizar ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes, comprendiendo el sistema (10) de análisis
5 una matriz (12) de ácido nucleico, que comprende:

un soporte que tiene ubicaciones (70) que, en funcionamiento, reciben muestras biológicas que comprenden secuencias de ácido nucleico y que difieren entre sí para responder de manera diferente en los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes; y
10 cuatro o más características fiduciales (84) sobre el soporte, teniendo las características fiduciales (84) un material fluorescente que responde en todos los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes, en donde las características fiduciales (84) están dispuestas sobre el soporte en una organización no rectilínea;
15 y un sistema (28) de imagenología que comprende un sistema de escaneo de líneas:
en donde el sistema (28) de imagenología está configurado para realizar ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes utilizando una pluralidad de líneas de escaneo.
2. El sistema de la reivindicación 1, en donde la organización no rectilínea comprende posiciones de características fiduciales que están a diferentes distancias X de un primer borde del soporte y a diferentes distancias Y de un segundo borde ortogonal del soporte, opcionalmente en donde la organización no rectilínea comprende una configuración hexagonal.
3. El sistema de la reivindicación 1, en donde la configuración no rectilínea comprende una organización de no repetición a lo largo del soporte.
- 25 4. El sistema de la reivindicación 1, en donde las ubicaciones difieren entre sí para responder de manera diferente en ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes que se realizan utilizando luz a diferentes longitudes de onda, opcionalmente en donde los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes se realizan utilizando luz a al menos dos longitudes de onda diferentes, y en donde el material fluorescente de las características fiduciales (84) es sensible a ambas de las al menos dos longitudes de onda diferentes.
- 30 5. El sistema de la reivindicación 1, en donde las características fiduciales comprenden una pluralidad de depresiones (98) y una perla (90) dispuesta en cada una de la pluralidad de depresiones, comprendiendo la perla el material fluorescente; opcionalmente en donde los objetos dispuestos en la al menos una depresión (98) son demasiado grandes para alojarse en las ubicaciones (92) del soporte que alojan las muestras biológicas.
- 35 6. El sistema de la reivindicación 1, en donde las ubicaciones están dispuestas en un patrón de repetición regular sobre el soporte.
- 40 7. El sistema de la reivindicación 1, en donde el soporte comprende una pluralidad de áreas o franjas (48) de imagen de las ubicaciones, y en donde se proporciona una pluralidad de las características fiduciales en cada una de la pluralidad de áreas o franjas de imagen.
- 45 8. El sistema de la reivindicación 1, en donde las características fiduciales están estructuradas para producir información de codificación de datos de imagen.
9. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además al menos una característica fiducial (270) adicional que está formada en o sobre el soporte y es ópticamente reflectante para, durante la obtención de imágenes, devolver al menos una parte de la radiación incidente para localizar, ajustar la ubicación de, o poner en correspondencia exacta el soporte o las ubicaciones.
- 50 10. Un método para analizar muestras biológicas usando ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes, comprendiendo el método:
55 disponer muestras biológicas que comprenden secuencias de ácido nucleico en ubicaciones sobre un soporte de una matriz de ácido nucleico, siendo diferentes las muestras biológicas entre sí para responder de manera diferente en los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes;
60 disponer cuatro o más características fiduciales sobre el soporte, comprendiendo cada una de las características fiduciales un material fluorescente que responde en todos los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes, en donde las características fiduciales están dispuestas sobre el soporte en una organización no rectilínea; y
65 obtener imágenes, mediante el uso de un sistema de escaneo de líneas, de las muestras biológicas y las características fiduciales en los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes utilizando una pluralidad de líneas de escaneo.

11. El método de la reivindicación 10, que comprende además obtener imágenes de las muestras biológicas y las características fiduciales en los ciclos sucesivos de obtención de imágenes fluorescentes a diferentes longitudes de onda de luz para producir datos de imagen que codifican señales fluorescentes producidas por las muestras biológicas y las características fiduciales.
5
12. El método de la reivindicación 11, que comprende además:
10 acceder a datos de imagen que codifican imágenes sucesivas de las muestras biológicas dispuestas en las ubicaciones del soporte, codificando además los datos de imagen imágenes de las características fiduciales sobre el soporte;
 poner en correspondencia exacta, para las imágenes sucesivas, las ubicaciones sobre el soporte mediante referencia a las características fiduciales; y
15 procesar las imágenes sucesivas puestas en correspondencia exacta para transformar datos derivados de las imágenes sucesivas en datos de secuencia.
13. El método de la reivindicación 12, que comprende además caracterizar moléculas que tienen etiquetas en las ubicaciones en cada una de las imágenes sucesivas.

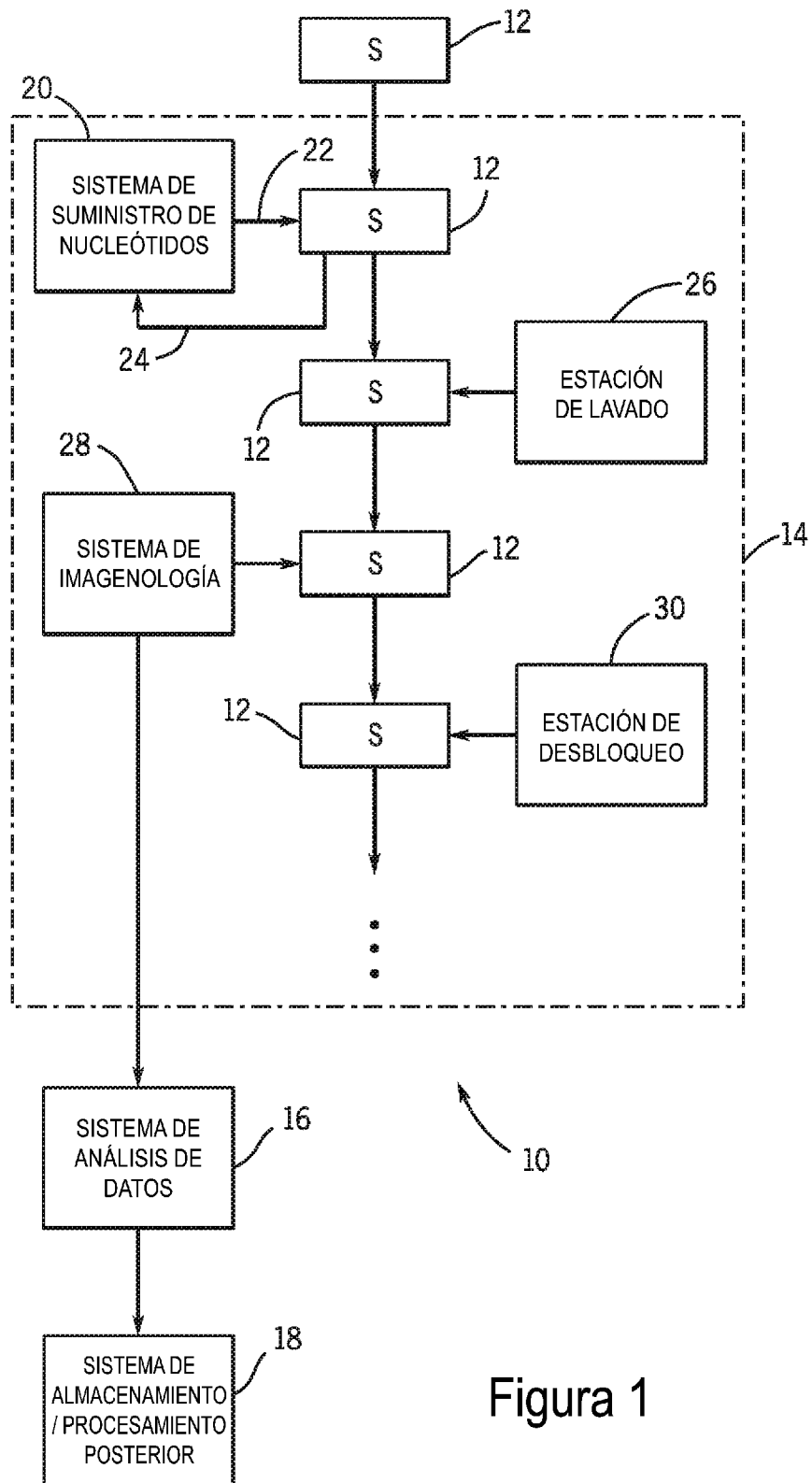


Figura 1

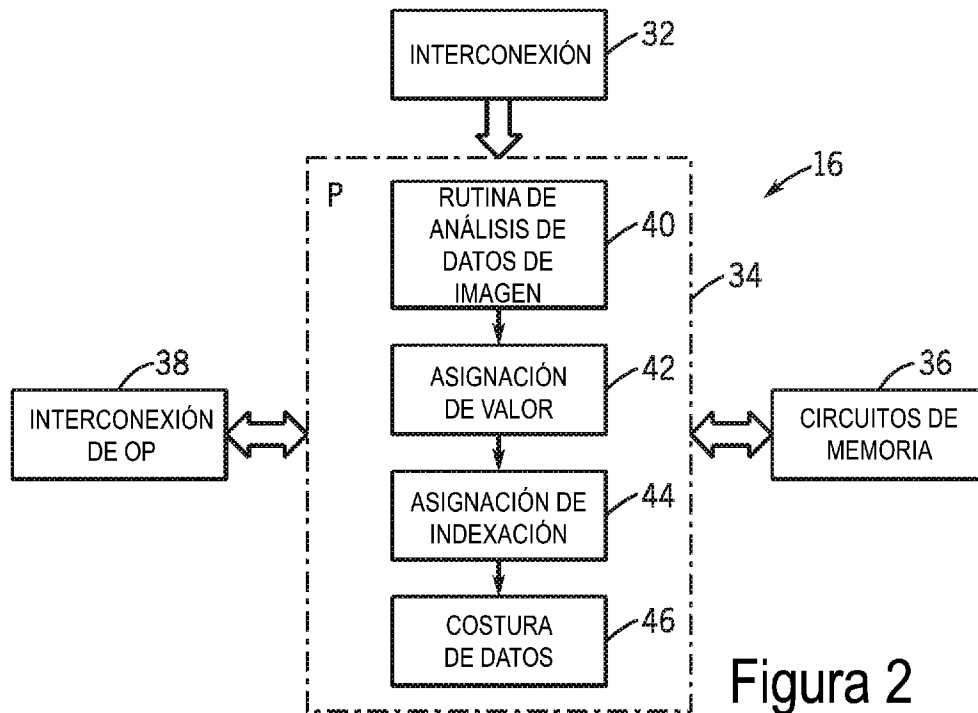


Figura 2

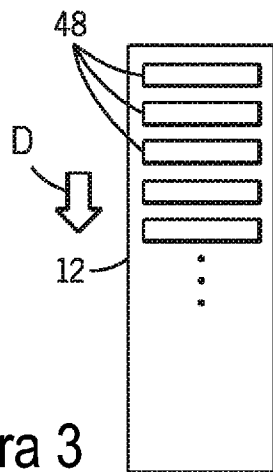


Figura 3

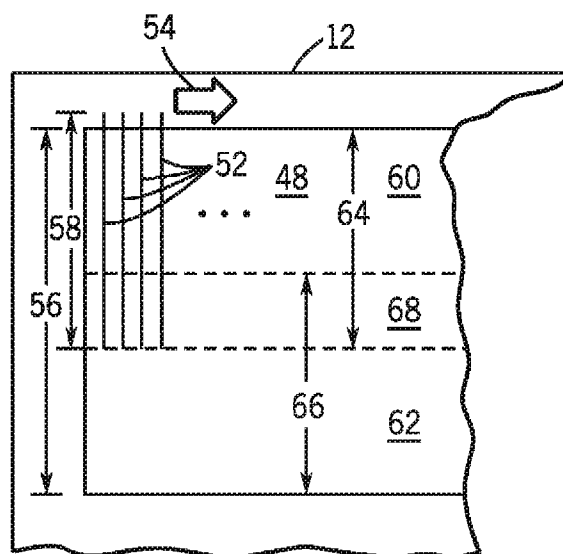
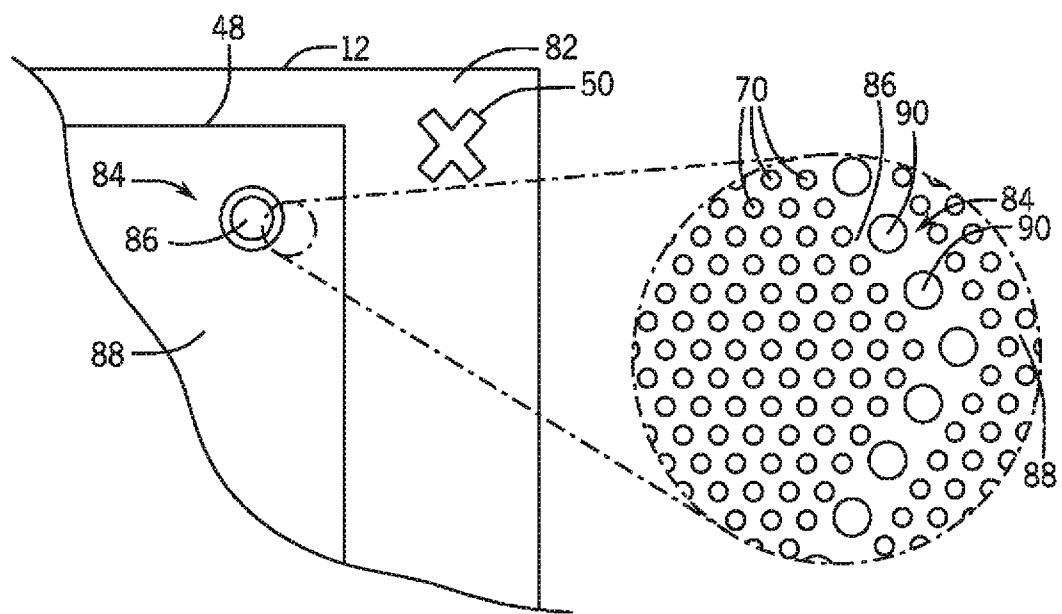
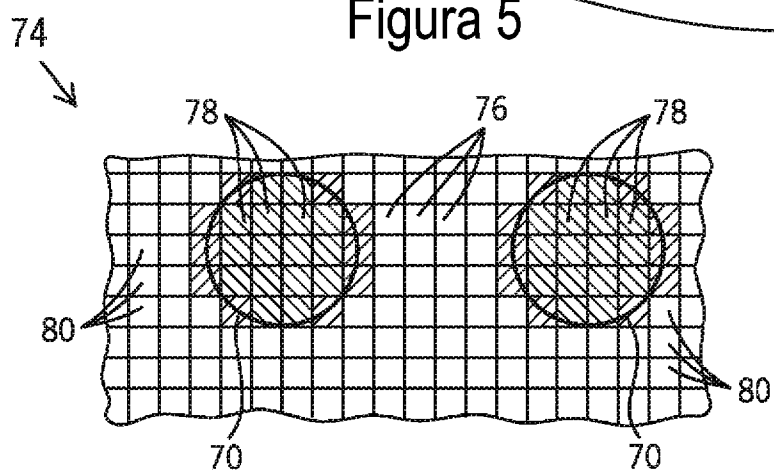
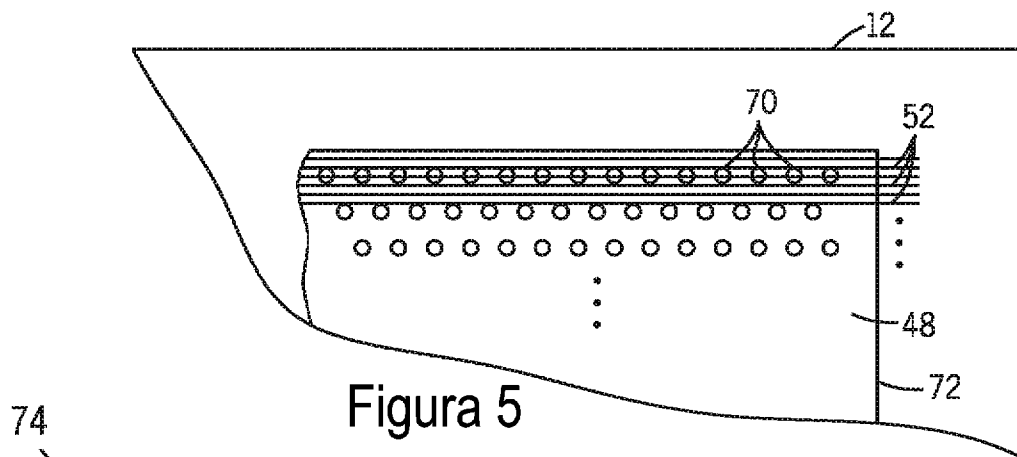


Figura 4



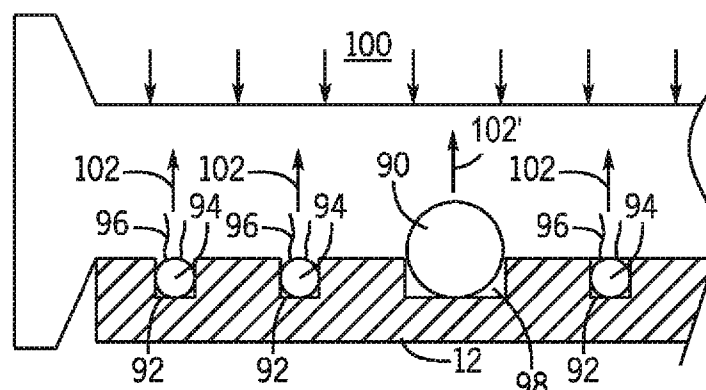


Figura 8A

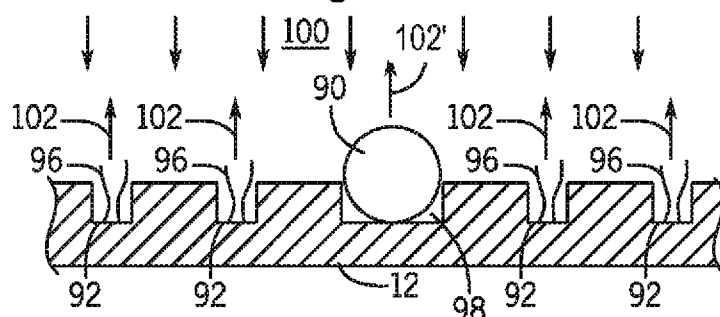


Figura 8B

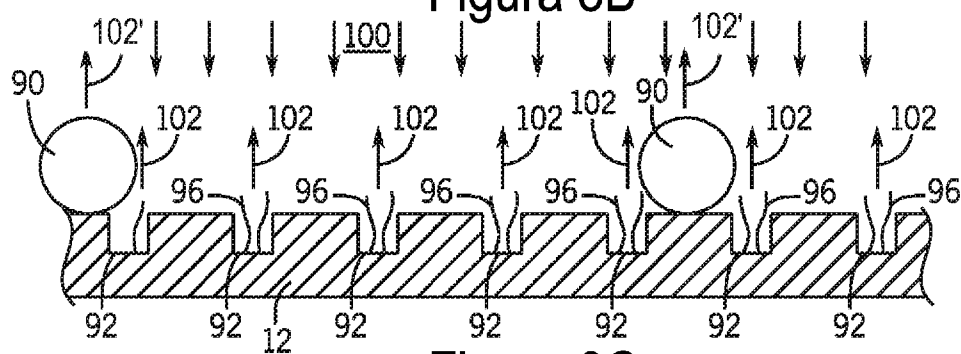


Figura 8C

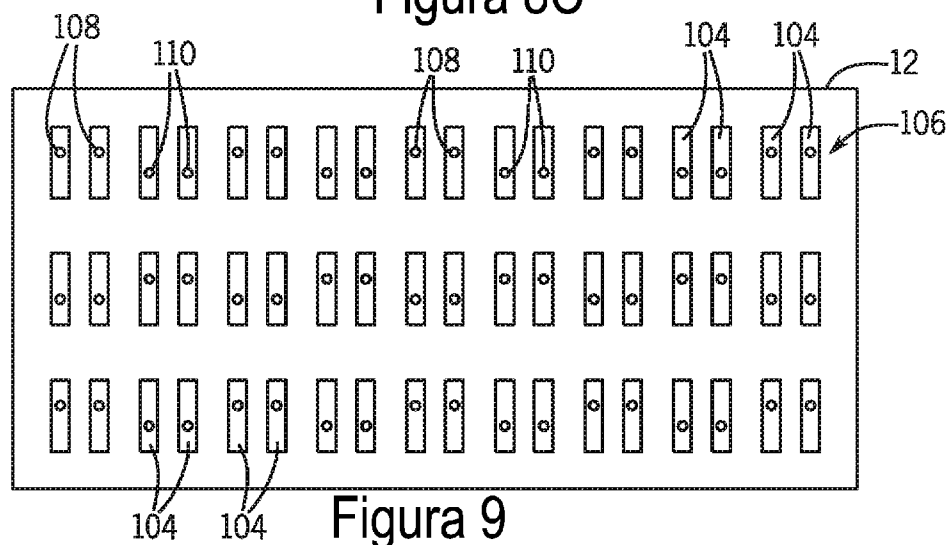


Figura 9

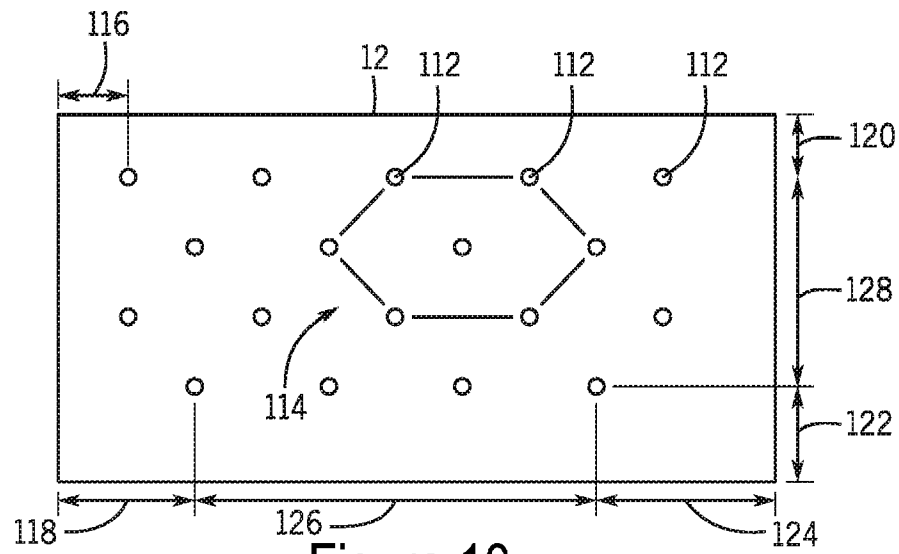


Figura 10

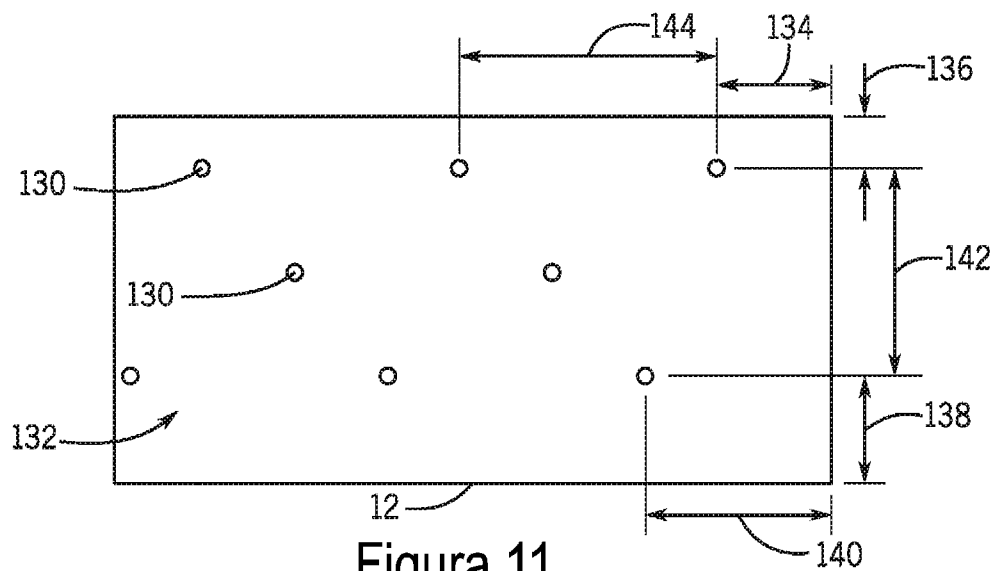


Figura 11

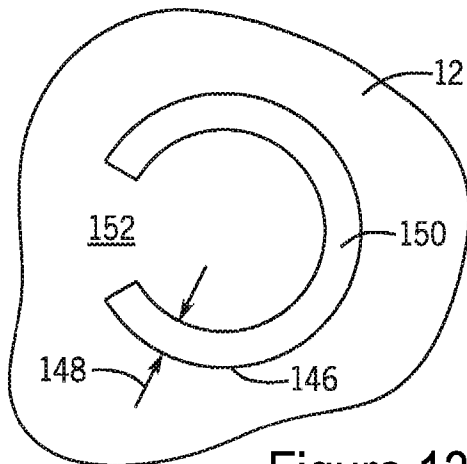


Figura 13

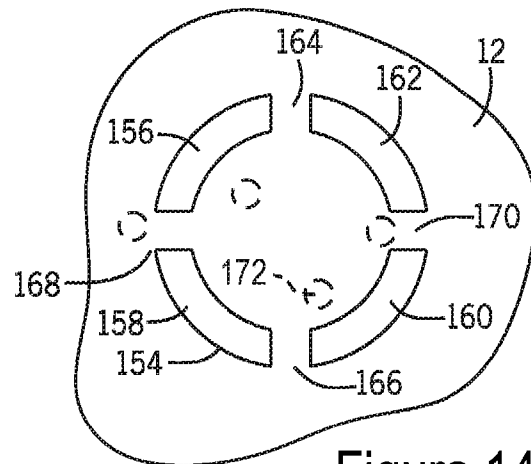
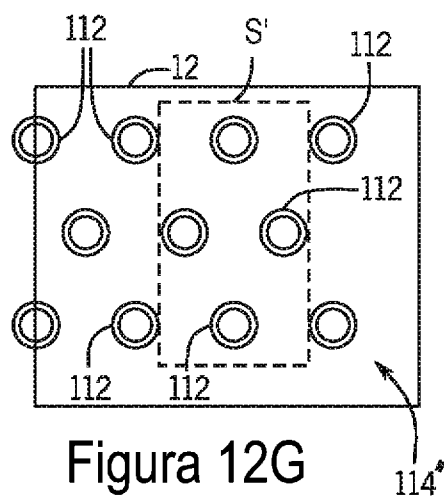
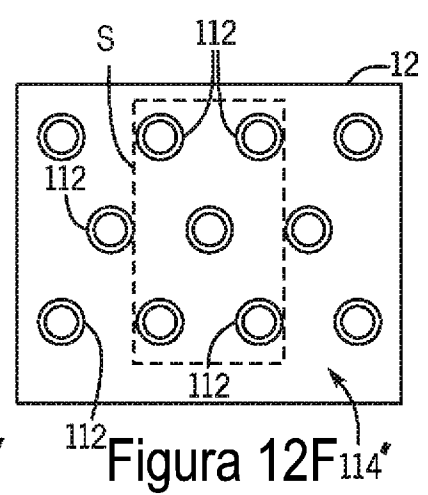
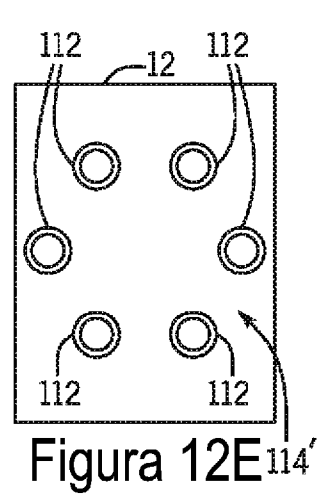
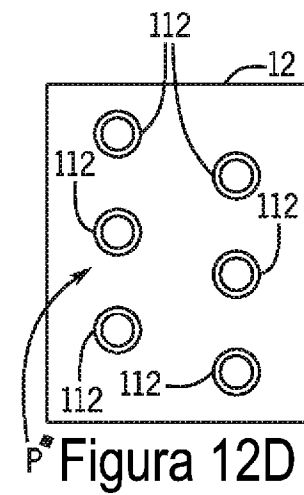
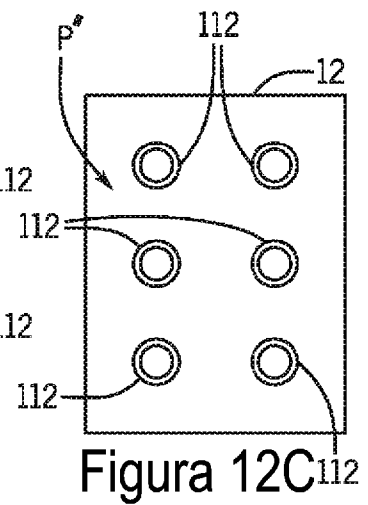
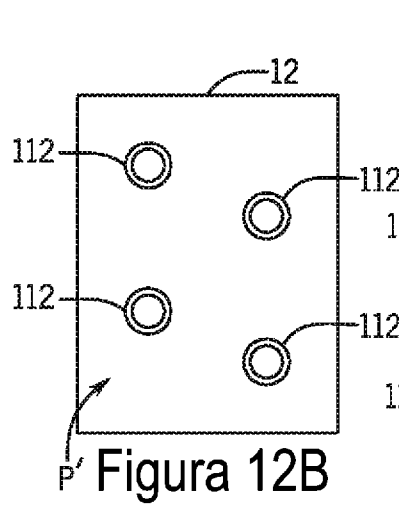
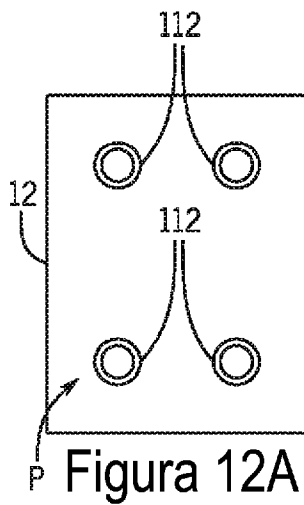


Figura 14



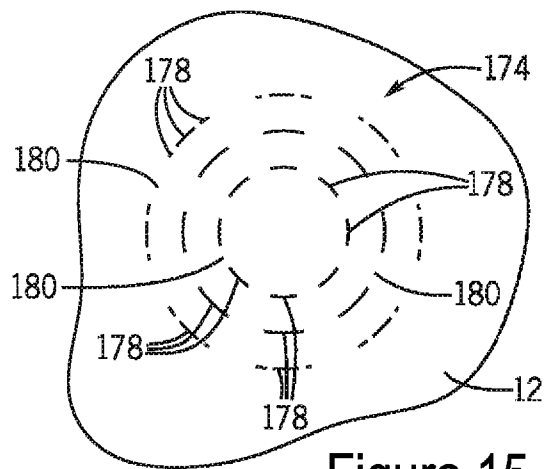


Figura 15

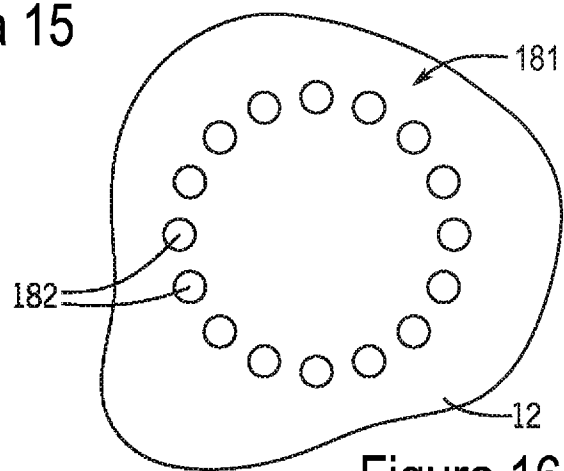


Figura 16

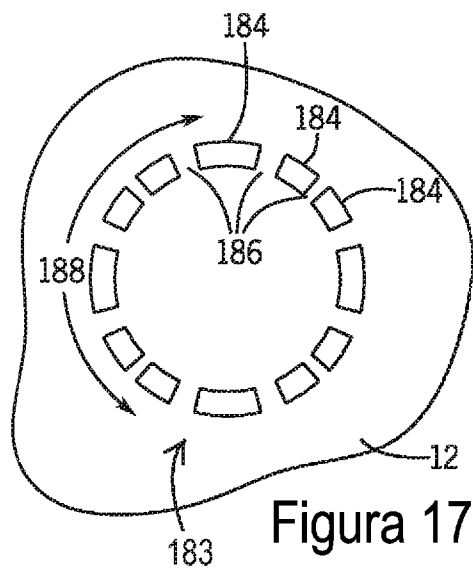


Figura 17

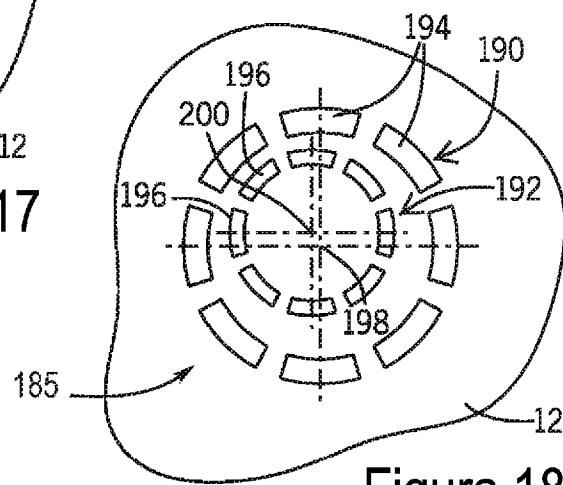
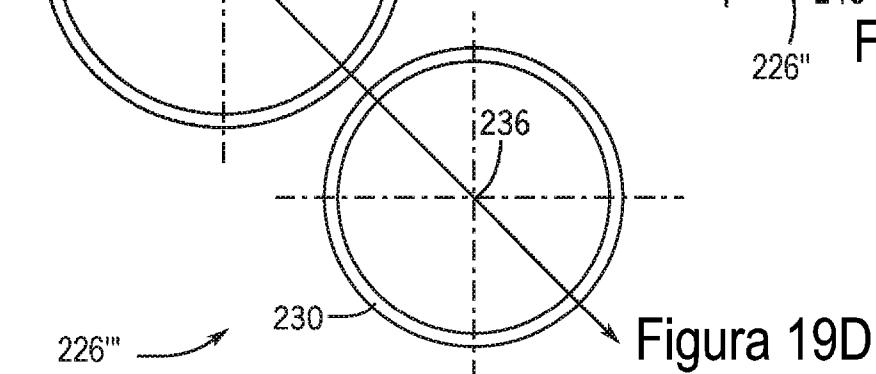
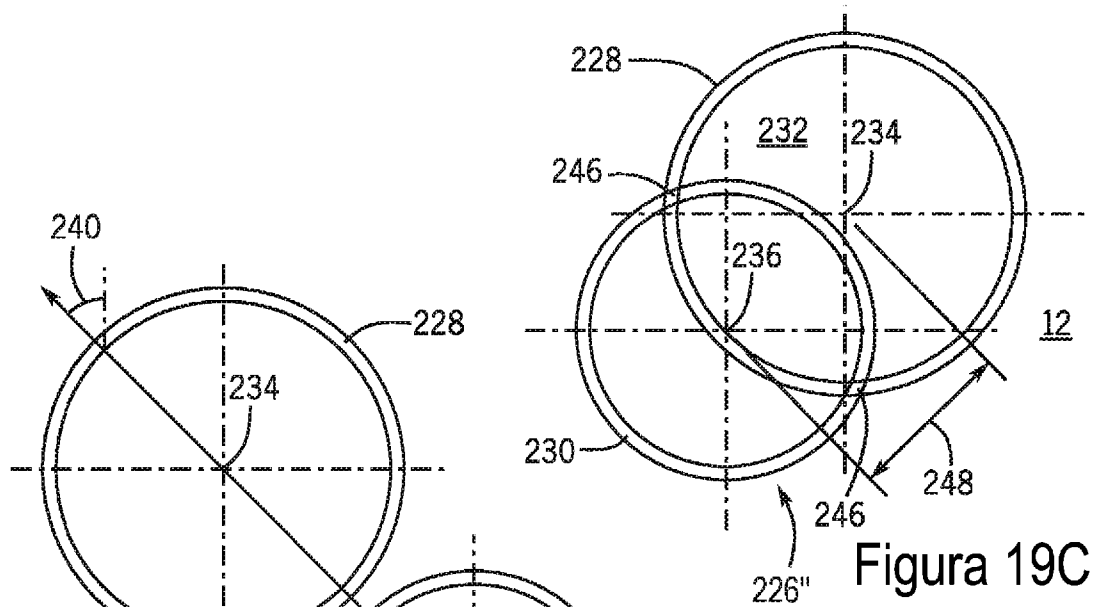
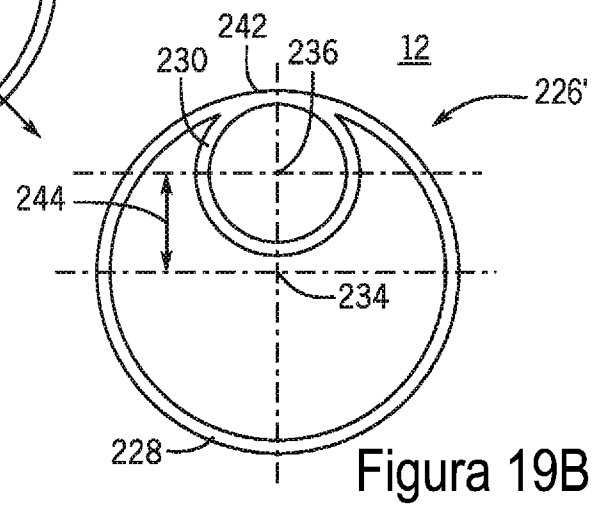
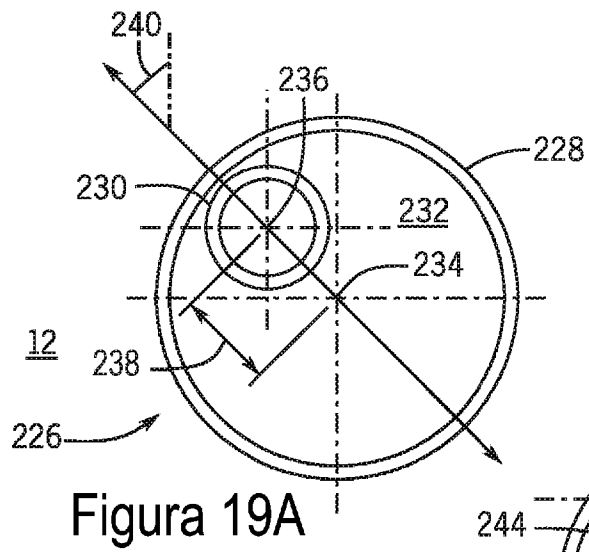
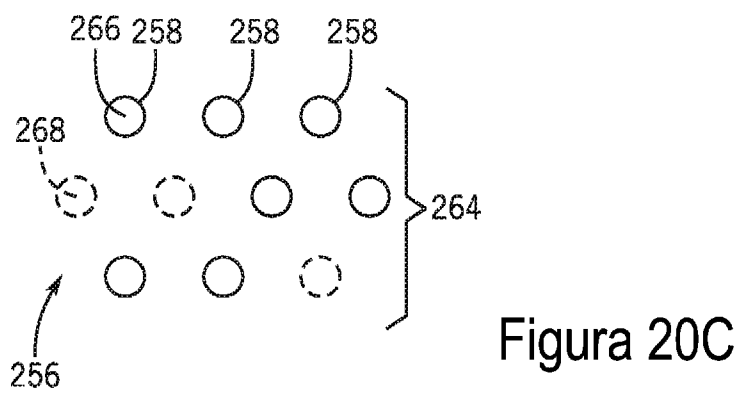
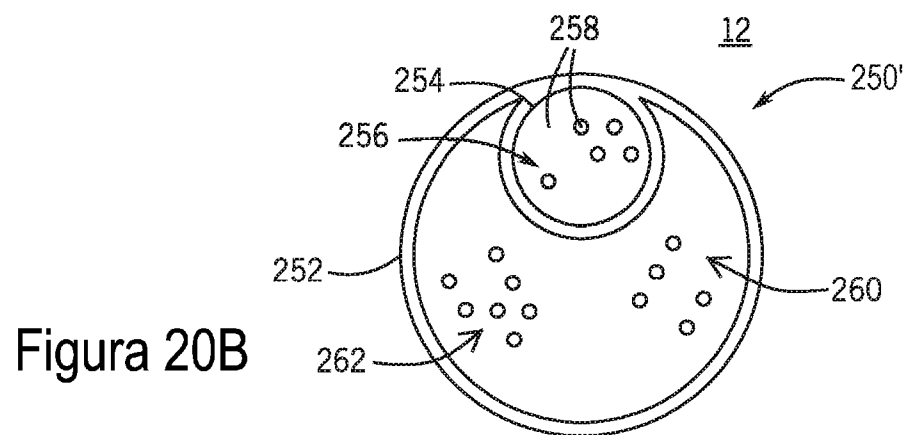
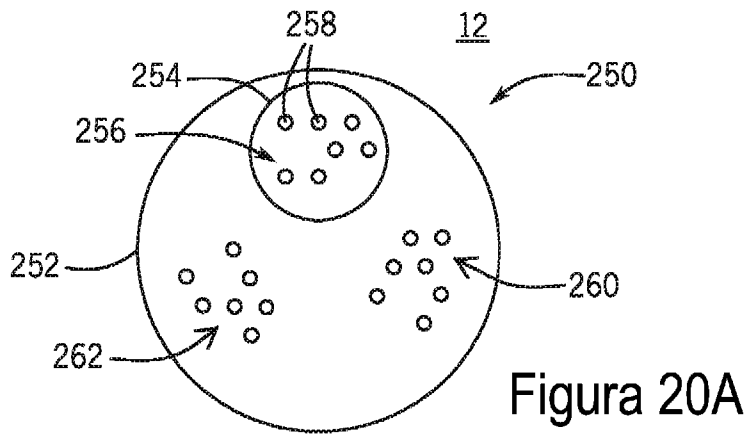
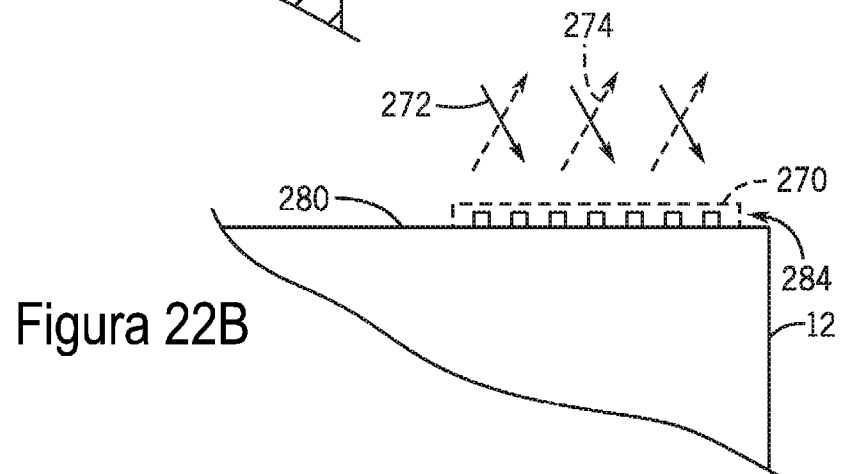
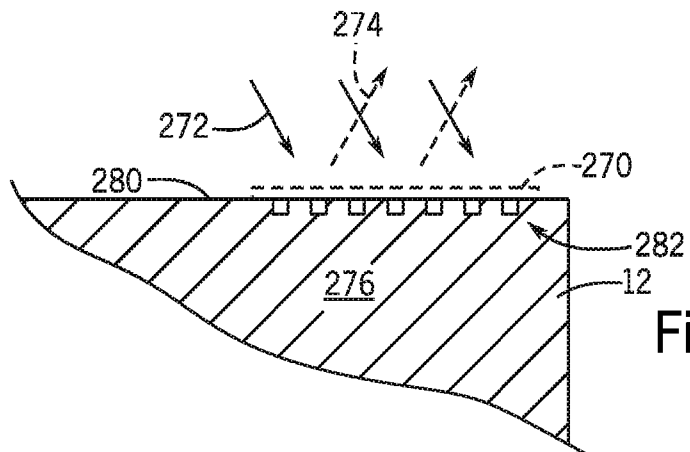
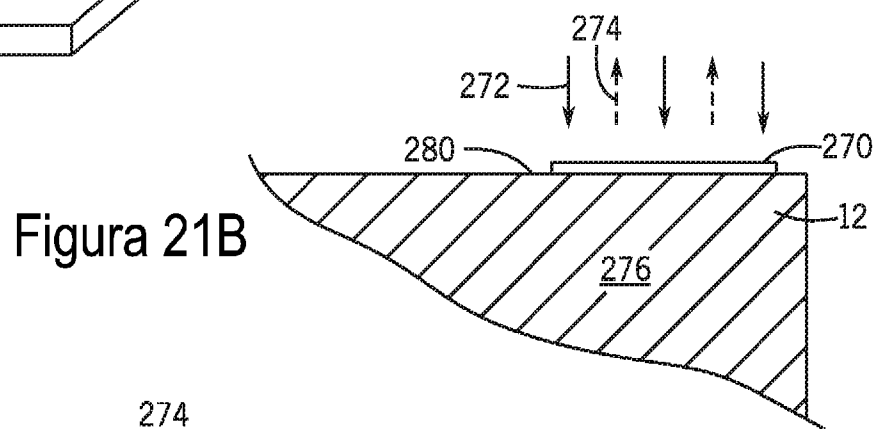
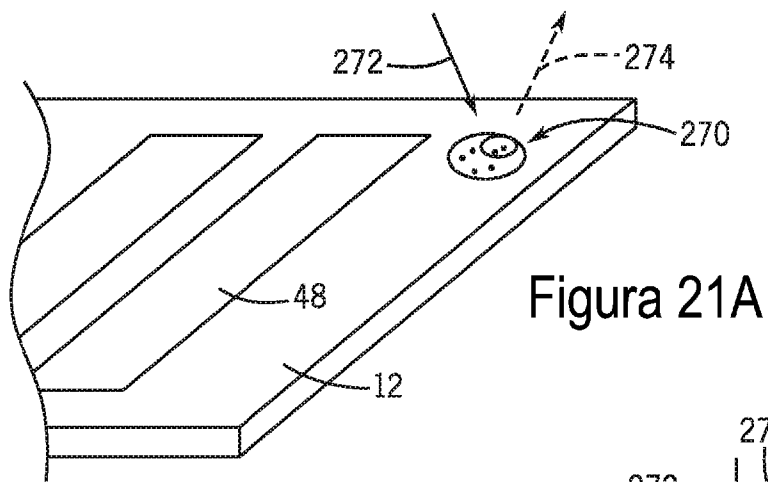


Figura 18







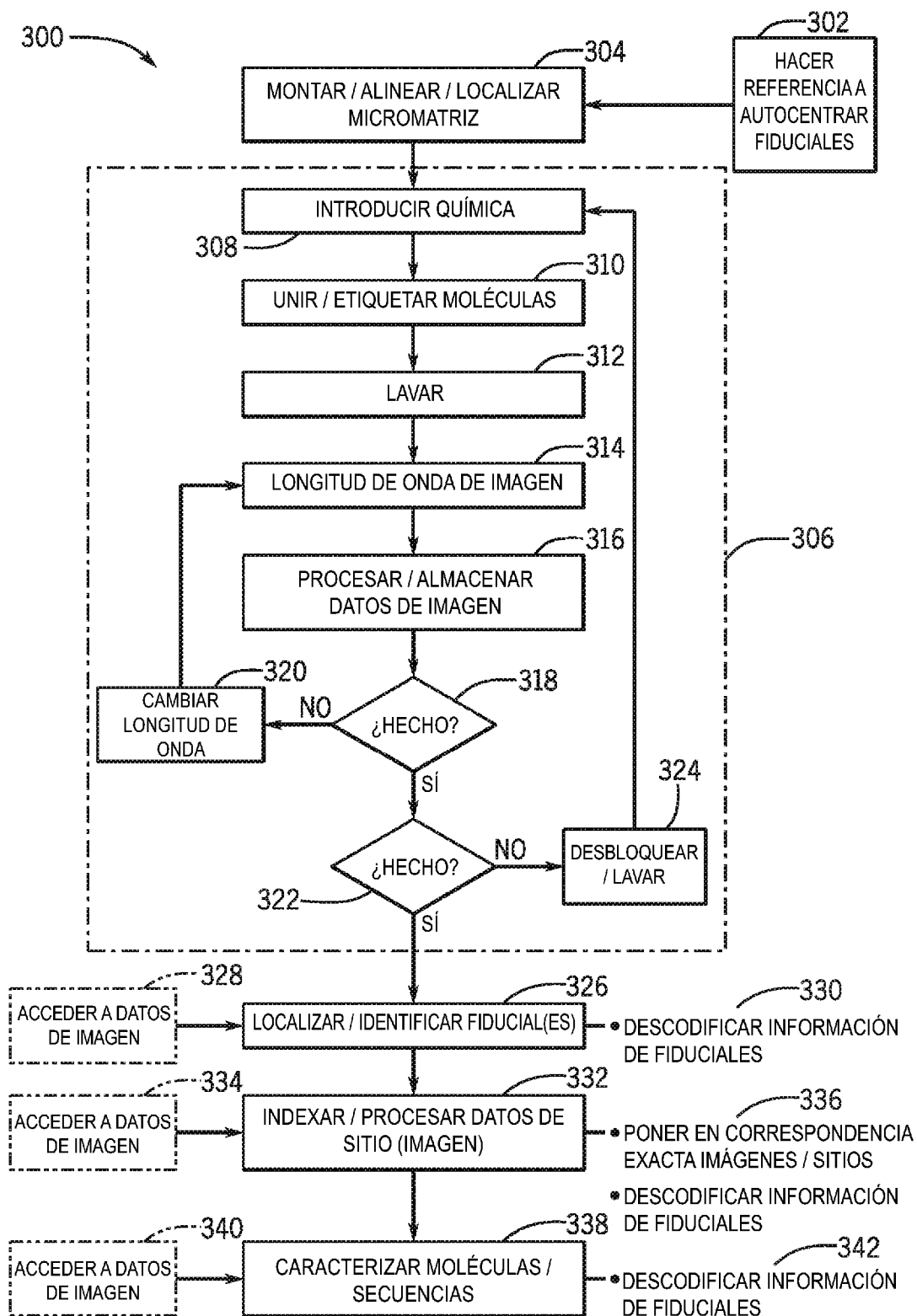


Figura 23