

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 819**

51 Int. Cl.:

C12M 1/33 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2002 E 02803281 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 1450959**

54 Título: **Aparato y método para el fraccionamiento rápido de células o virus**

30 Prioridad:

04.10.2001 US 972221

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

05.03.2014

73 Titular/es:

**CEPHEID (100.0%)
904 CARIBBEAN DRIVE
SUNNYVALE, CA 94089, US**

72 Inventor/es:

TAYLOR, MICHAEL T.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 445 819 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

Aparato y método para el fraccionamiento rápido de células o virus

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un aparato y método para el fraccionamiento rápido de células o virus.

10 **Antecedentes de la invención**

10 La extracción de ácido nucleico de células o virus es una tarea necesaria para múltiples aplicaciones en los campos de la biología molecular y el diagnóstico biomédico. Una vez liberado de las células, el ácido nucleico puede utilizarse para el análisis genético, por ejemplo, para la secuenciación, identificación y cuantificación de patógenos, análisis de las mutaciones del ácido nucleico, análisis del genoma, estudios de la expresión génica, monitorización farmacológica, almacenamiento de bibliotecas de ADN para el descubrimiento de fármacos, etc. El análisis genético generalmente implica la amplificación y detección de ácido nucleico utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, las reacciones conocidas de amplificación de polinucleótidos incluyen la reacción en cadena de polimerasa (PCR; *polymerase chain reaction*, por sus siglas en inglés), reacción en cadena de ligasa (LCR; *ligase chain reaction*, por sus siglas en inglés), amplificación de replicasa QB (QBR; *QB replicase amplification*, por sus siglas en inglés), replicación de secuencia autosostenida (3SR; *self-sustained sequence replication*, por sus siglas en inglés), amplificación del desplazamiento de la cadena (SDA; *strand-displacement amplification*, por sus siglas en inglés), amplificación del ADN de "cadena ramificada", transcripción activada por ligamiento (LAT; *ligation activated transcription*, por sus siglas en inglés), amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA; *nucleic acid sequence-based amplification*, por sus siglas en inglés), amplificación del círculo rodante (RCA; *rolling circle amplification*; por sus siglas en inglés), reacción de reparación de cadena (RCR; *repair chain reaction*, por sus siglas en inglés) y reacción de sonda cíclica (CPR; *cycling probe reaction*, por sus siglas en inglés).

La extracción de ácidos nucleicos de células o virus generalmente se lleva a cabo mediante métodos físicos o químicos. Los métodos químicos suelen emplear agentes lisantes (por ejemplo, detergentes, encimas u orgánicos fuertes) para fraccionar las células y liberar el ácido nucleico, seguido del tratamiento del extracto con sales caotrópicas para desnaturalizar cualquier proteína contaminante o con potencial para interferir. Dichos métodos químicos se describen en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.652.141 de Henco et al. y Patente de los Estados Unidos Nº 5.856.174 de Lipshutz et al. Una desventaja del uso de químicos potentes para fraccionar células es que los químicos son inhibidores de la posterior amplificación del ácido nucleico. En el uso de métodos de fraccionamiento químico, por tanto, generalmente es necesario purificar el ácido nucleico liberado de las células antes de proceder con otros análisis. Dichas etapas de purificación conllevan tiempo, son caras y reducen la cantidad de ácido nucleico recuperado para el análisis.

Los métodos físicos para fraccionar células no suelen requerir químicos potentes que inhiben la amplificación del ácido nucleico (por ejemplo la PCR). Estos métodos físicos, no obstante, también presentan desventajas. Por ejemplo, un método físico para fraccionar células conlleva colocar las células en una solución y calentar la solución hasta que hierva para romper la pared de las células. Desgraciadamente, el calor suele desnaturalizar las proteínas y provocar que las proteínas se peguen al ácido nucleico liberado. Las proteínas interfieren por tanto con los posteriores intentos para amplificar el ácido nucleico. Otro método físico es el hielo-deshielo en el que las células se hielan y deshuelan repetidamente hasta que la pared de las células se rompe. Desgraciadamente, el hielo-deshielo suele ser incapaz de romper muchas estructuras, especialmente ciertas esporas y virus que tienen capas exteriores extremadamente fuertes.

Otro método físico para fraccionar células es el uso de un instrumento de presión. Con este método, una solución de microorganismos micobacterianos se hace pasar a alta presión a través de un orificio de diámetro muy pequeño. Durante el paso a través del orificio, las micobacterias se rompen debido a las fuerzas mecánicas y su contenido interno se vierte en la solución. Dicho sistema, no obstante, tiene cierta envergadura, es caro y requiere un sistema de enfriado para evitar un desarrollo excesivo del calor que dañaría el contenido de las células lisadas. Además, el instrumento debe limpiarse y descontaminarse entre cada utilización y se requiere un sistema de envase de gran tamaño cuando se manipula material infeccioso. Otra desventaja de este sistema es que la solución solo debe contener partículas que sean sustancialmente del mismo tamaño, de forma que no se pueda utilizar para procesar muchos de los especímenes clínicos o biológicos no tratados.

También se conoce que las células se pueden lisar sometiendo a las células a agitación por ultrasonidos. Este método es divulgado por Murphy et al. en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.374.522. De acuerdo con el método, las soluciones o suspensiones de células se colocan en un envase con perlas pequeñas.

El envase se coloca entonces en un baño de ultrasonidos hasta que se fraccionan las células, liberando sus componentes celulares. Este método tiene varias desventajas. En primer lugar, la distribución de la energía por ultrasonidos en el baño no es uniforme, por lo que un técnico deberá ubicar una zona de energía elevada dentro del baño y colocar el envase en esa zona. La distribución no uniforme de la energía por ultrasonidos produce además

5 resultados inconsistentes. En segundo lugar, el baño de ultrasonidos no focaliza la energía en el envase, por lo que el fraccionamiento de las células suele tardar varios minutos en completarse, un periodo de tiempo relativamente largo comparado con el método de la presente invención. En tercer lugar, no resulta práctico llevar un baño de ultrasonidos al campo para utilizarlo en la detección de guerras biológicas, análisis forenses o pruebas in situ de muestras medioambientales.

10 Otro método para el lisado de células por ultrasonidos se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 4.983.523 de Li. De acuerdo con el método, los ácidos nucleicos se liberan de las células, bacterias y virus sometiendo a ultrasonidos, de forma no invasiva, a una muestra contenida dentro de un envase de muestras que se pone en contacto físico con el elemento vibrador de un sistema de ultrasonidos calibrado para resonar a una frecuencia de 40kHz o superior. Un problema principal al poner en contacto la pared de un envase de muestras con el elemento vibrador de un sistema de ultrasonidos es que es muy probable que la vibración del sistema de ultrasonidos contra la pared provoque daños graves en la pared (generalmente derriéndola o agrietándola), lo que lleva a la contaminación de la zona de trabajo, un peligro para la salud del operador y la pérdida de la muestra que se iba a analizar.

Sumario

20 La presente invención proporciona un aparato y método mejorado para fraccionar células o virus para liberar el ácido nucleico de los mismos.

25 En una realización preferida, el aparato comprende un envase que tiene una cámara para albergar un líquido o gel que contiene las células o virus que se van a fraccionar. El envase incluye al menos una pared que define la cámara y la pared tiene una superficie exterior a la cámara. El aparato comprende además un dispositivo transductor para vibrar a una frecuencia y amplitud operativa suficiente como para generar ondas de presión o pulsos de presión en la cámara cuando el dispositivo transductor se ha acoplado a la pared. El aparato comprende además medios para acoplar el dispositivo transductor a la superficie exterior de la pared con una fuerza de precarga suficiente como para crear un esfuerzo en la pared. La frecuencia natural de la pared, cuando la pared se somete al esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor o menor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor en menos del 50% de la frecuencia operativa del dispositivo transductor.

35 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para fraccionar células o virus. El método comprende la etapa de albergar un líquido o gel que contiene las células o virus en la cámara de un envase. El envase incluye al menos una pared que define la cámara y la pared tiene una superficie exterior a la cámara. Un dispositivo transductor se acopla a la superficie exterior de la pared con una fuerza de precarga suficiente como para provocar un esfuerzo en la pared. El dispositivo transductor se opera a una frecuencia y amplitud suficiente como para generar ondas de presión o pulsos de presión en la cámara. La frecuencia natural de la pared, cuando la pared se somete al esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor o menor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor en menos del 50% de la frecuencia operativa del dispositivo transductor.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 es una vista isométrica de un aparato para fraccionar células o virus.
 La figura 2 es una vista transversal del aparato de la figura 1.
 La figura 3 es una vista transversal de un envase para utilizar en el aparato de la figura 1. La superficie vibratoria de un dispositivo transductor está acoplada a una pared del envase.
 La figura 4 es una vista transversal de la pared de la figura 3.
 50 La figura 5 es un diagrama en bloque esquemático de un sistema fluido que incorpora el aparato de la figura 1.
 Las figuras 6A-6B son vistas isométricas de lados opuestos de otra pared adecuada para su utilización en un envase para albergar las células o virus que se van a fraccionar.
 La figura 7 es una sección parcial de una vista isométrica de un envase que incorpora las paredes de las figuras 6A-6B.
 55 La figura 8 es una vista inferior en planta del envase de la figura 7.

Descripción detallada

60 La presente invención proporciona un aparato y método para fraccionar células o virus. Las células pueden ser células de animales o plantas, esporas, bacterias o microorganismos.

Los virus pueden ser cualquier tipo de agentes infecciosos que tengan una capa de proteínas recubriendo un núcleo de ARN o ADN.

65 Todas las publicaciones y solicitudes de patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan a la presente por referencia expresa como si se indicara específica e individualmente la incorporación de cada una de las

publicaciones o solicitudes de patente por referencia expresa.

Las figuras 1-2 muestran un aparato 10 para fraccionar células o virus de acuerdo con una primera realización de la presente invención. La figura 1 muestra una vista isométrica del aparato 10 y la figura 2 muestra una vista transversal del aparato 10. Tal y como se muestra en las figuras 1-2, el aparato 10 incluye un cartucho o envase 18 que tiene una cámara 40 para albergar las células o virus. El envase incluye una pared 46 que define la cámara 40. El aparato 10 incluye además un dispositivo transductor 38, tal como un conjunto de cuerno de ultrasonidos, que tiene una superficie vibratoria acoplada a una superficie exterior de la pared 46 (es decir, una superficie de la pared 46 que es exterior a la cámara 40).

El dispositivo transductor 38 puede estar acoplado a la pared 46 poniendo la superficie vibratoria en contacto directo con la pared 46. Como alternativa, la superficie vibratoria del dispositivo transductor 38 puede estar acoplada a la pared 46 a través de otro elemento, tal como una capa de un material. Se puede disponer gel o líquido en la superficie vibratoria del dispositivo transductor o en la superficie exterior de la pared de la cámara para mejorar el contacto entre ambos.

La pared 46 proporciona una interfaz entre la superficie vibratoria del dispositivo transductor 38 y el contenido de la cámara 40. En la realización preferida, la pared 46 tiene forma de cúpula y es convexa con respecto al dispositivo transductor 38 (es decir, la pared 46 se curva hacia fuera hacia el dispositivo transductor). La pared es preferentemente una estructura que mantiene su forma cuando no está apoyada (al contrario que una película o membrana flexible), pero sigue siendo lo suficientemente elástica como para permitir deformaciones en respuesta al movimiento vibratorio del dispositivo transductor.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "dispositivo transductor" significa un dispositivo que convierte energía eléctrica en energía vibratoria. El dispositivo transductor tiene una superficie vibratoria para deformar la pared 46 de la cámara. El dispositivo transductor 38 deberá ser capaz de vibrar a una frecuencia y amplitud operativa suficiente como para deformar la pared 46 y crear pulsos de presión u ondas de presión en la cámara 40. En la realización preferida actual, el dispositivo transductor 38 es un conjunto de cuerno de ultrasonidos para someter la cámara 40 a ultrasonidos. El conjunto de cuerno de ultrasonidos incluye material piezoeléctrico y un cuerno que tiene una punta vibratoria 50 para ponerlo en contacto con la pared 46. La punta del cuerno 50 proporciona así la superficie vibratoria del dispositivo transductor. En esta realización, la frecuencia operativa del dispositivo transductor es preferentemente la frecuencia de resonancia del cuerno.

Aunque actualmente se prefiere un conjunto de cuerno de ultrasonidos, se entiende que también se pueden emplear diferentes tipos de dispositivos transductores en el aparato y método de la presente invención. Los dispositivos transductores adecuados incluyen dispositivos transductores por ultrasonidos, piezoeléctricos, magnetostrictivos o electrostáticos. El dispositivo transductor también puede ser un dispositivo electromagnético que tenga una bobina, tal y como un motor de bobina móvil o un dispositivo solenoide. La frecuencia operativa del dispositivo transductor puede ser de ultrasonidos (es decir, por encima de 20 kHz) o por debajo de los ultrasonidos (por ejemplo, en el intervalo de 60 a 20.000 Hz). La ventaja de utilizar frecuencias elevadas (por ejemplo, los ultrasonidos) es que el fraccionamiento de la célula es muy rápida y en general se puede completar en un tiempo de 10 a 20 segundos. La desventaja es que los dispositivos transductores de ultrasonidos suelen ser más caros que un vibrador mecánico simple, por ejemplo un altavoz o un dispositivo de bobina electromagnética.

En una realización alternativa, el dispositivo transductor 38 comprende material piezoeléctrico, por ejemplo, un apilamiento piezoeléctrico realizado de capas de material piezoeléctrico. La aplicación de un voltaje de CA a través del material piezoeléctrico provoca que el material piezoeléctrico vibre a una frecuencia y amplitud adecuada para fraccionar las células o virus en la cámara 40. En esta realización, el dispositivo piezoeléctrico incluye preferentemente una capa superior de un material (por ejemplo una lámina metálica o mylar) que se coloca en contacto con la superficie exterior de la pared de la cámara 46, de forma que el material piezoeléctrico esté acoplado a la pared de la cámara a través de la capa superior del material. Una ventaja de esta realización es que el apilamiento piezoeléctrico puede estar realizado de forma que vibre a frecuencias de ultrasonido para un fraccionamiento rápido de las células, lo que es considerablemente más barato que el conjunto de cuerno de ultrasonidos.

El aparato 10 incluye además una estructura de apoyo 12 para acoplar el dispositivo transductor 38 a la superficie exterior de la pared 46 con una fuerza de precarga. La estructura de apoyo 12 presiona el envase 18 y el dispositivo transductor uno contra otro, de forma que la superficie vibratoria del dispositivo transductor 38 esté acoplada a la superficie exterior de la pared 46 de la cámara. En una realización, la estructura de apoyo 12 incluye una estructura de base 14 que tiene una plataforma 16. El dispositivo transductor 38 está montado a la estructura de base 14 de forma que se puede deslizar por una guía 24. La guía 24 forma parte integral de la estructura de base 14 o está fijada a la estructura de base. La estructura de apoyo 12 incluye además un soporte 20 unido a la estructura de base 14 para sujetar el envase 18. El soporte 20 tiene una parte inferior en forma de U que proporciona acceso a la pared 46 de la cámara. La guía 24 y el soporte 20 están dispuestos para sujetar el dispositivo transductor 38 y el envase 18 respectivamente, de forma que la superficie exterior de la pared 46 esté en contacto con el dispositivo transductor 38. La estructura de apoyo 12 incluye además un retén superior 22 para el envase 18. El retén 22 tiene forma de U

para permitir el acceso a un puerto de salida 44 formado en el envase 18.

La estructura de apoyo 12 incluye además un cuerpo elástico, tal como un resorte 26, para aplicar una fuerza al dispositivo transductor 38 para presionar el dispositivo transductor 38 contra la pared 46. La superficie vibratoria del dispositivo transductor 38 se acopla así a la pared 46 con una fuerza de precarga suficiente como para crear un esfuerzo en la pared 46. El resorte 26 está colocado entre una guía del resorte 32 y la base de un acoplador 28 que sostiene la parte inferior del dispositivo transductor 38. Tal y como muestra la figura 1, el acoplador 28 preferentemente tiene una ventana 30 a través de la cual se puede colocar el cable de alimentación (no mostrado) del dispositivo transductor 38. Unos pernos o tornillos 36 sujetan la guía del resorte 32 en surcos de ajuste 34 formados en la estructura de base 14. La magnitud de la fuerza proporcionada por el resorte 26 se puede ajustar soltando los pernos 36 que sujetan la guía del resorte 32, moviendo la guía 32 a una nueva posición y volviendo a apretar los pernos 36 para que sujeten la guía 32 en la nueva posición. Una vez la posición del resorte 26 se ha ajustado para proporcionar una fuerza de precarga adecuada para acoplar el dispositivo transductor 38 a la pared 46, es deseable mantener la precarga constante entre un uso del aparato 10 y el siguiente.

La figura 3 muestra una vista transversal del envase 18. El envase 18 tiene un cuerpo que comprende una pieza superior 52, una pieza media 54 y una pieza inferior 56. La pieza media 54 define un puerto de entrada 42 a la cámara 40 y la pieza superior 52 define un puerto de salida 44 a la cámara. Los puertos 42 y 44 están colocados para permitir el flujo de una muestra fluida a través de la cámara 40. La pared 46 está sujeta entre las piezas media e inferior 54 y 56 mediante juntas 58 y 60. Como alternativa, la pared 46 se puede unir simplemente por termosellado a la pieza media 54 o moldearse como parte integral de la pieza media 54, de forma que se pueda eliminar la pieza inferior 56 y las juntas 58 y 60. El envase 18 incluye opcionalmente un material en fase sólida, tal como un filtro 48, en la cámara 40 para capturar las células o virus que se van a fraccionar según fluye la muestra a través de la cámara 40. Los materiales en fase sólida adecuados incluyen, por ejemplo, filtros, perlas, fibras, membranas, lana de vidrio, papel de filtro, polímeros y geles. Aunque solo se muestra un filtro en la figura 3, el envase 18 puede incluir múltiples filtros tal y como enseña la Publicación Internacional N° WO 00/73413 publicada el 7 de diciembre de 2000.

Para garantizar que las burbujas de aire pueden escapar de la cámara 40, es deseable utilizar el envase 18 en una orientación tal que el líquido fluya hacia arriba (en relación a la gravedad) a través del filtro 48 y la cámara 40. El flujo hacia arriba a través de la cámara 40 ayuda a que las burbujas fluyan hacia el exterior de la cámara. Así, el puerto de entrada 42 para la entrada de fluidos en la cámara 40 generalmente deberá estar a una elevación menor que el puerto de salida 44. La capacidad en volumen de la cámara 40 suele estar en el intervalo de 50 a 500 microlitros. La capacidad en volumen de la cámara 40 se selecciona para posibilitar la concentración del analito separado de una muestra fluida sin que la cámara sea tan pequeña que el filtro 48 se obstruya.

Las piezas 52, 54 y 56 que forman el cuerpo del envase 18 son preferentemente partes poliméricas moldeadas (por ejemplo, polipropileno, policarbonato, acrílico, etc.). Aunque se prefiere el moldeado para la producción en masa, también se pueden mecanizar las piezas superior, media e inferior 52, 54 y 56. Las piezas 52, 54 y 56 pueden sujetarse entre sí mediante tornillos o cierres. Como alternativa, se puede utilizar el enlace mediante ultrasonidos, enlace mediante disolvente o diseños de ajustes a presión para montar el envase 18. Otro método para fabricar el envase 18 es moldear el cuerpo como una pieza única y unir la pared 46 y el filtro 48 al cuerpo por termosellado.

El aparato puede incluir opcionalmente perlas 66 en la cámara 40 para romper las células o virus para liberar el material intracelular (por ejemplo el ácido nucleico) de los mismos. Los pulsos de presión u ondas de presión generadas por el dispositivo transductor 38 agitan las perlas 66 y el movimiento de las perlas 66 rompe las células o virus. Las perlas adecuadas para romper las células o virus incluyen perlas cristal de borosilicato, cristal de calcio, sílice y poliestireno. Las perlas pueden ser porosas o no porosas y tener preferentemente un diámetro medio dentro del intervalo de 5 a 200 micrómetros. En la realización preferida actual, las perlas 66 son perlas de poliestireno que tienen un diámetro medio de aproximadamente 106 micrómetros.

La figura 5 muestra un sistema fluídico adecuado para ser utilizado con el aparato. El sistema incluye una botella 72 para albergar el tampón de lavado, una botella 74 que contiene la solución de lavado y un envase de muestras 76 para albergar una muestra fluida. Las botellas 72 y 74 y el envase de muestras 76 están conectados mediante tubos a los puertos de las válvulas de una bomba de jeringa 78. El puerto de entrada del envase 18 está conectado además a la bomba de la jeringa 78. El puerto de salida del envase 18 está conectado al puerto común de una válvula de distribución 80. El sistema incluye además un tubo recolector 82 para recibir material intracelular (por ejemplo ácido nucleico) extraído de la muestra y un envase de desechos 84 para recibir los desechos. El tubo recolector 82 y el envase de desechos 84 están conectados a los puertos periféricos correspondientes de la válvula de distribución 80.

Durante la operación, la bomba de la jeringa 78 bombea una muestra fluida del envase de muestras 76 a través del envase 18 y al envase de desechos 84. Según se fuerza a la muestra fluida a fluir a través del filtro 48 en la cámara 40 (figura 3), las células o virus de la muestra son capturados por el filtro 48. La cámara 40 puede someterse a ultrasonidos según se fuerza a la muestra a fluir a través de la cámara para ayudar a evitar la obstrucción del filtro 48. A continuación, la bomba de la jeringa 78 bombea solución de lavado de la botella 74 a través del envase 18 y

hacia el envase de desechos 84. La solución de lavado lava los inhibidores y contaminantes de la PCR de la cámara 40.

5 En la siguiente etapa, la bomba de la jeringa 78 bombea el tampón de lisado de la botella 72 al envase 18 de forma que la cámara 40 se llena de líquido. El tampón de lisado deberá ser un medio a través del cual se puedan transmitir los pulsos de presión u ondas de presión dinámica. Por ejemplo, el tampón de lisado puede comprender agua desionizada para albergar las células o virus en suspensión o solución. Como alternativa, el tampón de lisado puede incluir uno o más agentes de lisado para ayudar al fraccionamiento de las células o virus. Una de las ventajas de la presente invención, no obstante, es que no se requieren agentes de lisado potentes para el correcto fraccionamiento de las células o virus. Aunque actualmente se prefiere separar las células o virus de una muestra fluida utilizando un filtro tal y como se ha descrito, deberá entenderse que el filtrado no es fundamental para el aparato y método de la invención. Por ejemplo, las células o virus que se van a fraccionar se pueden colocar en la cámara del envase simplemente llenando la cámara 40 con un líquido que contenga las células o virus (por ejemplo, llenando la cámara con una muestra acuosa que contenga las células o virus que se vayan a fraccionar). En esta realización, la propia muestra acuosa proporciona el medio líquido a través del cual se transmiten las ondas de presión o pulsos de presión.

20 De nuevo en referencia a la figura 2, el dispositivo transductor 38 está acoplado a la superficie exterior de la pared 46 con una fuerza de precarga que provoca un esfuerzo en la pared 46. Para fraccionar las células o virus en la cámara 40, se activa el dispositivo transductor 38 (es decir, se induce a un movimiento vibratorio). Según la punta 50 del dispositivo transductor 38 vibra, esta deforma la pared 46. La interacción del dispositivo transductor 38, la pared 46 de la cámara y el líquido en la cámara 40 es una característica de la frecuencia natural de la pared 46, la frecuencia operativa del dispositivo transductor 38, la fuerza de precarga entre el dispositivo transductor 38 y la pared 46 y la amplitud del movimiento vibratorio del dispositivo transductor 38. Estos parámetros determinan la magnitud de las ondas de presión o pulsos de presión generados en la cámara 40 y el fraccionamiento de las células o virus resultante en la cámara.

30 La frecuencia natural de la pared 46 es la frecuencia que provoca que la pared vibre a su mayor amplitud. La precarga se aplica para mantener el acoplamiento entre la pared 46 y el dispositivo transductor 38. La precarga crea un esfuerzo compresor en la pared 46 en forma de cúpula que disminuye su frecuencia natural por debajo de su frecuencia natural en un estado de no esfuerzo. Cuando se activa, el dispositivo transductor 38 se convierte en una estructura vibratoria atrapada entre la pared 46 y el resorte 26. La masa del dispositivo transductor 38 combinada con el resorte 26 es un sistema de masa/resorte con una frecuencia natural que depende de la rigidez del resorte 26. El resorte 26 suele seleccionarse de forma que proporcione una fuerza de precarga dentro del intervalo de 4 a 35 N que resulta en una frecuencia natural del sistema de masa/resorte de aproximadamente 20 Hz, la cual es mucho menor que la frecuencia operativa preferida del dispositivo transductor 38 (por ejemplo 20 a 120 kHz).

40 Si la frecuencia natural de la pared 46 cuando la pared se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es mucho mayor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor 38, el dispositivo transductor (cuando está atrapado entre la pared rígida y el resorte relativamente débil) forzará la estimulación del resorte 26. En este caso, el dispositivo transductor 38 actuará como un martillo neumático, golpeando la superficie vibratoria del dispositivo transductor la pared 46 repetidamente. No obstante, la pared 46 se comportará como un miembro rígido, deformándose solo ligeramente por los impactos. Cada impacto creará un ligero aumento en la presión o pulso en la cámara 40, pero no se generarán caídas de presión para que dicha cavitación sea limitada. Así, cuando se utiliza esta técnica del martillo neumático, el movimiento vibratorio del dispositivo transductor no se transfiere completamente al líquido en la cámara 40 y el fraccionamiento de las células y virus, de haberlo, será limitado. Además, la pared se puede dañar (por ejemplo derretirse o agrietarse) por los repetidos impactos.

50 Si la frecuencia natural de la pared 46, cuando la pared se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es mucho menor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor 38, la pared 46 será incapaz de vibrar a la misma frecuencia que el dispositivo transductor 38. El movimiento vibratorio resultante del dispositivo transductor 38 y la pared 46 se desfazará y la pared y el dispositivo transductor se separarán físicamente, es decir, la superficie vibratoria del dispositivo transductor 38 golpeará repetidamente la pared 46 en su golpe hacia delante y se separará físicamente de la pared en su golpe de retirada. Este modo de operación puede derretir o dañar la pared de la cámara y el fraccionamiento de las células o virus, de haberlo, será limitado.

60 De acuerdo con la presente invención, la frecuencia natural de la pared 46, cuando la pared se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, deberá estar próxima a la frecuencia operativa del dispositivo transductor 38. Cuando este sea el caso, la pared 46 se estimula a su frecuencia de resonancia o a un valor próximo a esta y la pared 46 transfiere eficientemente el movimiento vibratorio del dispositivo transductor 38 a la cámara 40 sin derretirse ni agrietarse. En particular, la frecuencia natural de la pared 46, cuando la pared se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, deberá ser igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor o diferir de la frecuencia operativa del dispositivo transductor en menos del 50 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor, más preferentemente en menos del 25 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor y aún más preferentemente en menos del 10 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor. Por ejemplo, si la superficie vibratoria del dispositivo transductor vibra a una frecuencia operativa de 40 kHz, la

frecuencia natural de la pared 46, cuando la pared se somete a un estrés ejercido por la fuerza de precarga, deberá estar en el intervalo de 20 a 60 kHz, más preferentemente en el intervalo de 30 a 50 kHz y aún más preferentemente en el intervalo de 36 a 44 kHz.

5 Cuando la frecuencia natural de la pared 46, cuando se somete a un estrés ejercido por la fuerza de precarga, se calibra a la frecuencia operativa del dispositivo transductor 38 tal y como se ha descrito anteriormente, el dispositivo transductor 38 genera fuertes ondas de presión o pulsos de presión en la cámara 40 y se pueden alcanzar fuertes caídas de presión en la cámara. La cavitación (la creación y rotura de burbujas microscópicas) suele darse en la cámara 40. Según estas burbujas o cavidades crecen al tamaño de resonancia, colapsan de forma violenta,
10 produciendo cambios locales de presión muy elevados. Los cambios de presión proporcionan un choque mecánico a las células o virus, que resulta en su fraccionamiento. El fraccionamiento de las células o virus puede venir provocado también por aumentos bruscos de presión resultantes del movimiento vibratorio del dispositivo transductor 38. Además, el fraccionamiento de las células o virus puede venir provocado por el movimiento violento de las perlas 66 en la cámara 40. Las perlas se agitan por los pulsos u ondas de presión dinámicas en la cámara y por la rotura de las células o virus. El alcance de la invención no está limitado al uso de perlas 66 en la cámara 40. Las perlas 66 ayudan a fraccionar rápidamente ciertos tipos de células (en particular las esporas) que tienen paredes celulares muy duras. Otros tipos de células, tales como las células sanguíneas, tienen paredes celulares más débiles que suelen poder fraccionarse sin el uso de perlas.

20 Puesto que la frecuencia natural de la pared de la cámara, cuando la pared se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, se calibra a la frecuencia operativa del dispositivo transductor, la pared transfiere de forma eficiente la energía de la superficie vibratoria del dispositivo transductor a la cámara sin que se genere un desarrollo sustancial del calor en la interfaz. Esto permite la transferencia eficiente de energía a la cámara y el rápido lisado de las células o virus en el a cámara sin derretir o agrietar el envase.

25 La cámara 40 se somete a ultrasonidos preferentemente de 10 a 20 segundos a una frecuencia operativa en el intervalo de 20 a 120 kHz. En el protocolo de ejemplo, la cámara se somete a ultrasonidos durante 15 segundos a una frecuencia de 40 kHz. La amplitud del movimiento vibratorio del dispositivo transductor está preferentemente en el intervalo de 5 a 60 micrómetros (medida de pico a pico). De nuevo en referencia a la figura 5, después de la disminución del fraccionamiento de las células o virus, la bomba de la jeringa 78 bombea el material intracelular liberado (por ejemplo, ácido nucleico) del envase 18 al tubo recolector 82.

La figura 4 muestra una vista transversal de la pared 46. La pared 46 tiene forma de cúpula y es convexa con respecto al dispositivo transductor (es decir, la pared 46 se curva hacia fuera hacia el dispositivo transductor). La ventaja del diseño en forma de cúpula de la pared 46 es que la forma de cúpula aumenta la frecuencia natural de la pared (en comparación con una pared plana) sin provocar que la pared sea tan rígida que no se pueda deformar para transferir los movimientos vibratorios del dispositivo transductor a la cámara. La parte de la pared en forma de cúpula es preferentemente esférica (es decir, tiene la forma del segmento de una esfera). La pared 46 puede incluir además un borde exterior plano 70 para fijar con abrazaderas la pared 46 entre otras piezas del envase (mostrado en la figura 3). Como alternativa, la pared 46 se puede moldear como parte integral con una o más piezas del envase para que el borde exterior plano 70 se pueda eliminar. La frecuencia natural de la pared 46, cuando la pared se somete a un estrés ejercido por la fuerza de precarga, depende de la fuerza de precarga y de los siguientes parámetros de la pared: espesor T, radio esférico R, radio de la base A, altura o elevación de la base H, densidad del material de la pared, módulo de elasticidad y coeficiente de Poisson.

45 Como primer ejemplo de trabajo, el solicitante utilizó con éxito una pared en forma de cúpula con un espesor T de 0,5 mm (espesor uniforme en toda la pared), un radio esférico R de 12,7 mm, un radio de la base A de 5,16 mm y una elevación H de 1,5 mm. La pared se realizó de acetal (por ejemplo Delrin® DuPont Inc.), teniendo esta un módulo de elasticidad de 3378 N/mm², una densidad de 1,42 g/cm³ y un coeficiente de Poisson de 0,35. El dispositivo transductor se acopló a la pared con una fuerza de precarga de 8,9 N. La pared tenía una frecuencia natural de aproximadamente 38 kHz. En este ejemplo, el dispositivo transductor era un conjunto de cuerno de ultrasonidos (disponible comercialmente en Sonics & Materials) con una punta vibratoria para ponerlo en contacto con la pared. El dispositivo transductor se operó de 10 a 20 segundos a una frecuencia operativa de 40 kHz (la frecuencia de resonancia del cuerno). La amplitud del movimiento vibratorio (medida de pico a pico) estaba en el
50 intervalo de 25 a 40 micrómetros.

Como segundo ejemplo de trabajo, el solicitante utilizó con éxito una pared en forma de cúpula con un espesor T de 0,5 mm (espesor uniforme en toda la pared), un radio esférico R de 19 mm, un radio de la base A de 5,16 mm y una elevación H de 1,2 mm. La pared se realizó de acetal (por ejemplo Delrin® DuPont Inc.), teniendo esta un módulo de elasticidad de 3378 N/mm², una densidad de 1,42 g/cm³ y un coeficiente de Poisson de 0,35. El dispositivo transductor se acopló a la pared con una fuerza de precarga de 4,4 N. La pared tenía una frecuencia natural de aproximadamente 32 kHz. El dispositivo transductor era un conjunto de cuerno de ultrasonidos con una punta vibratoria para ponerlo en contacto con la pared. El dispositivo transductor se operó de 10 a 20 segundos a una frecuencia operativa de 40 kHz (la frecuencia de resonancia del cuerno). La amplitud del movimiento vibratorio (medida de pico a pico) estaba en el
60 intervalo de 25 a 40 micrómetros.
65

Los ejemplos anteriores no pretenden limitar el alcance de la invención. Se pueden seleccionar muchos otros valores de parámetro para satisfacer el requisito de que la frecuencia natural de la pared 46 sea igual a o esté dentro del 50 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor. Los valores de parámetro adecuados para satisfacer estos requisitos se pueden seleccionar utilizando software de análisis de elementos finitos, el cual está ampliamente disponible en el mercado. Por ejemplo, un paquete de software COSMOS/Works® está disponible comercialmente en Structural Research and Analysis Corporation, 12121 Wilshire Blvd. 7th Floor, Los Angeles, California, 90025.

Al diseñar una pared de la cámara adecuada, el espesor de la pared T está preferentemente en el intervalo de 0,25 a 1 mm. Si el espesor de la pared T es menor que 0,25 mm, la pared 46 podría ser demasiado débil o difícil de fabricar. Si el espesor de la pared T es mayor que 1 mm, la pared podría ser demasiado rígida para deformarse convenientemente en respuesta a los movimientos vibratorios del dispositivo transductor. La pared 46 es preferentemente una parte moldeada en plástico. Los materiales adecuados para la pared 46 incluyen acetal, polipropileno o policarbonato. Además, la frecuencia operativa del dispositivo transductor está preferentemente en el intervalo de 20 a 120 kHz, la amplitud (de pico a pico) de la superficie vibratoria del dispositivo transductor está preferentemente en el intervalo de 5 a 60 micrómetros y la fuerza de precarga está preferentemente en el intervalo de 2 a 50 N.

Realizaciones alternativas

Aunque actualmente se prefiere una pared de la cámara en forma de cúpula, la pared puede tener formas alternativas, tal como una pared que incluya nervaduras de refuerzo, que sea plana o que tenga partes con espesores diferentes. Por ejemplo, en una realización alternativa, la pared de la cámara tiene la forma de un disco plano circular. La aplicación de una fuerza de precarga a la pared plana provoca una tensión de tracción que aumenta su frecuencia natural por encima de su frecuencia natural en el estado de no esfuerzo. Las dimensiones de la pared se seleccionan de forma que la frecuencia natural de la pared, cuando la pared se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor o difiere de la frecuencia operativa del dispositivo transductor en menos del 50 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor, más preferentemente en menos del 25 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor y aún más preferentemente en menos del 10 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor. Al seleccionar las dimensiones de la pared plana de la cámara, el espesor de la pared está preferentemente en el intervalo de 0,25 a 1 mm. Si el espesor de la pared es menor que 0,25 mm, la pared plana podría ser demasiado débil. Si el espesor de la pared es mayor que 1 mm, la pared podría ser demasiado rígida para deformarse convenientemente en respuesta a los movimientos vibratorios del dispositivo transductor.

Como ejemplo específico de trabajo de una pared plana adecuada, la pared puede tener la forma de un disco circular con un radio de 4,5 mm y un espesor de 0,5 mm (espesor uniforme en toda la pared). La pared está realizada de acetal (por ejemplo Delrin® DuPont Inc.) con un módulo de elasticidad de 3378 N/mm², una densidad de 1,42 g/cm³ y un coeficiente de Poisson de 0,35. El dispositivo transductor está acoplado a la pared con una fuerza de precarga de 4,4 N. La pared tiene una frecuencia natural de aproximadamente 20 kHz cuando se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga. El dispositivo transductor se opera de 10 a 20 segundos a una frecuencia operativa de 20 kHz. La amplitud del movimiento vibratorio del dispositivo transductor (medida de pico a pico) está preferentemente en el intervalo de 5 a 60 micrómetros. Este ejemplo no pretende limitar el alcance de la invención y se pueden seleccionar muchos otros valores de parámetro (por ejemplo, utilizando software de análisis de elementos finitos) para satisfacer el requisito de que la frecuencia natural de la pared, cuando la pared se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, esté dentro del 50 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor.

Las figuras 6A-6B ilustran otra pared de la cámara 86 para poner en contacto la superficie vibratoria de un dispositivo transductor de acuerdo con la presente invención. Tal y como se muestra en la figura 6A, un lado de la pared 86 tiene una parte central 88 y una pluralidad de nervaduras de refuerzo 90 que se extienden radialmente desde la parte central 88. La pared tiene además recesos 92 formados entre las nervaduras 90. Tal y como se muestra en la figura 6B, el otro lado de la pared 86 tiene una superficie lisa 94. La figura 7 muestra una sección parcial de la vista isométrica del envase 18 con la pared 86. La pared 86 está preferentemente colocada de forma que el lado de la pared que tiene la superficie lisa esté orientado hacia el interior de la cámara y de forma que el lado de la pared que tiene las nervaduras 90 esté orientado hacia el exterior de la cámara. Las nervaduras 90 son ventajosas porque aumentan la frecuencia natural de la pared 86 (en comparación con una pared lisa) sin provocar que la pared sea tan rígida que no se pueda deformar en respuesta a los movimientos vibratorios del dispositivo transductor.

La figura 8 muestra una vista inferior en planta del envase 18 con la pared 86. La parte central 88 configura la superficie externa de la pared 86 para ponerse en contacto con un dispositivo transductor. Las dimensiones de la pared 86 se seleccionan para satisfacer el requisito de que la frecuencia natural de la pared, cuando se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, sea igual a o esté dentro del 50 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor, más preferentemente dentro del 25 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor y aún más preferentemente dentro del 10 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor. Las dimensiones de la pared adecuadas para satisfacer estos requisitos se pueden seleccionar utilizando software de análisis de

elementos finitos (por ejemplo, COSMOS/Works® disponible comercialmente en Structural Research and Analysis Corporation). La pared 86 es preferentemente una parte moldeada en plástico. Los materiales adecuados para la pared 86 incluyen acetal, polipropileno o policarbonato.

- 5 De nuevo en referencia a la figura 7, la interacción de la pared nervada 86 con el dispositivo transductor es similar a la interacción de la pared en forma de cúpula con el dispositivo transductor anteriormente descrita. La superficie vibratoria de un dispositivo transductor se acopla a la superficie exterior de la pared 86 (preferentemente se acopla a la parte central de la pared) con una fuerza de precarga que provoca un esfuerzo en la pared, generalmente una mezcla de tensión de tracción y compresión. Para fraccionar las células o virus en la cámara del envase 18, se activa el dispositivo transductor y la superficie vibratoria del dispositivo transductor deforma la pared 86. Cuando la frecuencia natural de la pared 86, cuando se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, se calibra a la frecuencia operativa del dispositivo transductor tal y como se ha descrito anteriormente, el dispositivo transductor genera fuertes ondas de presión o pulsos de presión en la cámara y se pueden alcanzar fuertes caídas de presión en la cámara. La cavitación suele darse, resultando en el fraccionamiento de las células o virus en la cámara. Además, el fraccionamiento de las células o virus puede venir provocado opcionalmente por el movimiento violento de las perlas en la cámara.

- 20 La cámara se somete a ultrasonidos preferentemente de 10 a 20 segundos a una frecuencia operativa en el intervalo de 20 a 120 kHz. En el protocolo de ejemplo, la cámara se somete a ultrasonidos durante 15 segundos a una frecuencia de 40 kHz. La amplitud del movimiento vibratorio del dispositivo transductor está preferentemente en el intervalo de 5 a 60 micrómetros (medida de pico a pico). La pared superior de la cámara puede tener opcionalmente acanaladuras de flujo 96. Las acanaladuras de flujo 96 son útiles para canalizar líquido y burbujas de aire hacia el exterior de la cámara a través del puerto de salida 44.

- 25 El envase para albergar las células o virus no tiene por qué ser el envase específico descrito anteriormente en la realización preferida. Cualquier tipo de envase que tenga una cámara para albergar las células o virus se puede utilizar para poner en práctica la invención, siempre y cuando el envase tenga una pared de la cámara adecuada de acuerdo con los principios de la presente invención. Los envases adecuados incluyen, sin limitación, recipientes de reacción, cubetas, módulos y cartuchos. El envase puede tener múltiples cámaras y/o canales para llevar a cabo múltiples preparaciones de muestras y funciones de análisis, por ejemplo, purificar el ácido nucleico liberado de las células o virus lisados, mezclar el ácido nucleico con reactivos y/o amplificar y detectar el ácido nucleico. Dichos envases se divulgan en la Solicitud Internacional N° PCT/US00/14738 presentada el 30 de mayo de 2000, Solicitud Internacional N° PCT/US01/23776 presentada el 26 de julio de 2001, la Patente de los Estados Unidos N° 6.374.684, Patente de los Estados Unidos N° 6.391.541 y Patente de los Estados Unidos N° 6.440.725. Como alternativa, el envase puede contener solo una única cámara para albergar células o virus para su fraccionamiento.

- 40 Existen muchos medios diferentes posibles para acoplar la superficie vibratoria de un dispositivo transductor a la pared de la cámara con una fuerza de precarga de acuerdo con el aparato y método de la presente invención. Por ejemplo, en una realización alternativa, los medios de acoplamiento incluyen un perno o abrazadera para presionar el dispositivo transductor y el envase entre sí. En otra realización, los medios de acoplamiento comprenden un instrumento o aparato dentro del cual se coloca el envase para el procesamiento de las muestras. El instrumento incluye un lugar de nidificación para recibir el envase y el dispositivo transductor se coloca en el instrumento de forma que la superficie vibratoria del dispositivo transductor esté a continuación a la superficie exterior de la pared de la cámara cuando el envase se coloca en el lugar de nidificación. El instrumento puede incluir un cuerpo elástico (por ejemplo un resorte) para proporcionar la fuerza de precarga para presionar el dispositivo transductor contra la pared de la cámara. Como alternativa, el dispositivo transductor se puede simplemente fijar rígidamente al instrumento y el envase se puede sujetar con abrazaderas a la superficie del dispositivo transductor para proporcionar la fuerza de precarga, por ejemplo, cerrando el envase con una tapa.

- 50 En otra realización, los medios de acoplamiento comprenden un sistema de presión para aplicar presión de aire para apretar el dispositivo transductor y el envase el uno contra el otro. Como alternativa, se puede utilizar fuerza magnética o gravitacional para acoplar el dispositivo transductor y el envase con la fuerza de precarga. En cada realización de la invención, se puede aplicar fuerza al dispositivo transductor (o al soporte en el que esté colocado el dispositivo transductor), al envase (o al soporte en el que esté colocado el envase) o tanto al dispositivo transductor como al envase.

- 60 En las realizaciones en las que se utiliza un cuerpo elástico para proporcionar la fuerza de precarga entre el dispositivo transductor y la pared de la cámara, los cuerpos elásticos adecuados incluyen, sin limitación, resortes helicoidales, resortes ondulados, resortes de torsión, resortes espirales, resortes de lámina, resortes elípticos, resortes medio elípticos, resortes de goma y resortes atmosféricos. Preferentemente, el cuerpo elástico es un resorte helicoidal. Los resortes helicoidales se prefieren porque su colocación en el aparato es sencilla y no supone coste económico. Además, en cada una de estas realizaciones, el cuerpo elástico puede estar colocado bien para que el dispositivo transductor y el envase se empujen entre sí o tiren el uno del otro. Por ejemplo, se puede colocar un resorte para proporcionar la fuerza de precarga bien empujando o tirando. Además, se pueden emplear múltiples cuerpos elásticos para aplicar fuerzas.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para fraccionar células o virus, comprendiendo dicho aparato:

- 5 a) Un envase (18) con una cámara (40) para albergar las células o virus, donde el envase (18) incluye al menos una pared (46; 86) que define la cámara (40) y donde la pared (46; 86) tiene una superficie exterior a la cámara (40);
b) un dispositivo transductor (38) para vibrar a una frecuencia y amplitud operativa suficiente como para generar ondas de presión o pulsos de presión en la cámara (40) cuando el dispositivo transductor (38) se acopla a la
10 pared (46; 86); y
c) medios para acoplar el dispositivo transductor a la superficie exterior de la pared con una fuerza de precarga suficiente para provocar un esfuerzo dentro de la pared;

15 donde la frecuencia natural de la pared (46; 86), cuando la pared se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) o menor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) en menos del 50 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38).

2. El aparato de la reivindicación 1, donde la frecuencia operativa es de ultrasonidos.

20 3. El aparato de la reivindicación 2, donde el dispositivo transductor (38) comprende un cuerno de ultrasonidos que tiene una punta (50) acoplada a la pared (46; 86) y donde la frecuencia operativa es la frecuencia de resonancia del cuerno.

25 4. El aparato de la reivindicación 1, donde el dispositivo transductor (38) comprende un apilamiento piezoeléctrico.

5. El aparato de la reivindicación 1, donde la pared (46, 86) tiene forma de cúpula y es convexa con respecto al dispositivo transductor (38).

30 6. El aparato de la reivindicación 1, donde la pared (46; 86) es esférica y convexa con respecto al dispositivo transductor (38).

7. El aparato de la reivindicación 1, donde la pared (46; 86) es plana.

35 8. El aparato de la reivindicación 7, donde la pared (46; 86) incluye una parte central (88) y nervaduras de refuerzo (90) que se extienden radialmente desde la parte central (88).

9. El aparato de la reivindicación 1, comprendiendo este además perlas (66) en la cámara (40) para romper las células o virus.

40 10. El aparato de la reivindicación 1, donde la cámara (40) tiene al menos dos puertos colocados para permitir el flujo de una muestra a través de la cámara (40) y donde el aparato comprende además un material en fase sólida en la cámara (40) para capturar las células o virus según fluye la muestra a través de la cámara (40).

45 11. El aparato de la reivindicación 1, donde la frecuencia natural de la pared (46; 86), cuando la pared (46; 86) se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) o menor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) en menos del 25 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38).

50 12. El aparato de la reivindicación 1, donde la frecuencia natural de la pared (46; 86), cuando la pared (46; 86) se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) o menor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) en menos del 10 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38).

55 13. El aparato de la reivindicación 1, donde la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) está en el intervalo de 20 a 120 kHz, la amplitud del movimiento vibratorio del dispositivo transductor (38) está en el intervalo de 5 a 60 micrómetros y la fuerza de precarga está en el intervalo de 2 a 50 N.

60 14. El aparato de la reivindicación 1, donde los medios para acoplar el dispositivo transductor (38) a la pared (46; 86) comprenden una estructura de apoyo para sujetar el envase (18) y el dispositivo transductor (38) el uno contra el otro de forma que la superficie vibratoria del dispositivo transductor (38) se ponga en contacto con la superficie exterior de la pared (46; 86), incluyendo dicha estructura de apoyo un cuerpo elástico para proporcionar la fuerza de precarga.

65 15. El aparato de la reivindicación 14, donde el cuerpo elástico comprende un resorte.

16. El aparato de la reivindicación 1, donde los medios para acoplar la superficie vibratoria del dispositivo transductor (38) a la pared (46; 86) comprenden una abrazadera.
- 5 17. Un método para fraccionar células o virus, comprendiendo el método las etapas de:
- 10 a) albergar un líquido o gel que contiene las células o virus en la cámara (40) de un envase (18) donde el envase (18) incluye al menos una pared (46; 86) que define la cámara (40) y donde la pared (46; 86) tiene una superficie exterior a la cámara (40);
- 10 b) acoplar un dispositivo transductor (38) a la superficie exterior de la pared (46; 86) con una fuerza de precarga suficiente como provocar un esfuerzo dentro de la pared (46; 86); y
- 10 c) operar el dispositivo transductor (38) a una frecuencia y amplitud suficientes como para generar ondas de presión o pulsos de presión en la cámara (40);
- 15 donde la frecuencia natural de la pared (46; 86), cuando la pared (46; 86) se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) o menor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) en menos del 50 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38).
- 20 18. El método de la reivindicación 17, donde la frecuencia operativa es de ultrasonidos.
- 20 19. El método de la reivindicación 17, donde el dispositivo transductor (38) comprende un cuerno de ultrasonidos que tiene una punta (50) acoplada a la pared (46; 86), y donde la frecuencia operativa es la frecuencia de resonancia del cuerno.
- 25 20. El método de la reivindicación 17, donde el dispositivo transductor (38) comprende un apilamiento piezoeléctrico.
21. El método de la reivindicación 17, donde la pared (46; 86) tiene forma de cúpula y es convexa con respecto al dispositivo transductor (38).
- 30 22. El método de la reivindicación 17, donde la pared (46; 86) es esférica y convexa con respecto al dispositivo transductor (38).
23. El método de la reivindicación 17, donde la pared (46; 86) es plana.
- 35 24. El método de la reivindicación 23, donde la pared (46; 86) incluye una parte central (88) y nervaduras de refuerzo (90) que se extienden radialmente desde la parte central (88).
25. EL método de la reivindicación 17, comprendiendo este además la etapa de agitar las perlas (66) en la cámara (40) para romper las células o virus.
- 40 26. El método de la reivindicación 17, comprendiendo además la etapa de capturar las células o virus en un material en fase sólida en la cámara (40) forzando a una muestra fluida que contiene las células o virus a que fluya a través de la cámara (40).
- 45 27. El método de la reivindicación 17, donde la frecuencia natural de la pared (46; 86), cuando la pared (46; 86) se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) o menor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) en menos del 25 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38).
- 50 28. El método de la reivindicación 17, donde la frecuencia natural de la pared (46; 86), cuando la pared (46; 86) se somete a un esfuerzo ejercido por la fuerza de precarga, es igual a la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) o menor que la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) en menos del 10 % de la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38).
- 55 29. El método de la reivindicación 17, donde la frecuencia operativa del dispositivo transductor (38) está en el intervalo de 20 a 120 kHz, la amplitud del movimiento vibratorio del dispositivo transductor (38) está en el intervalo de 5 a 60 micrómetros y la fuerza de precarga está en el intervalo de 2 a 50 N.

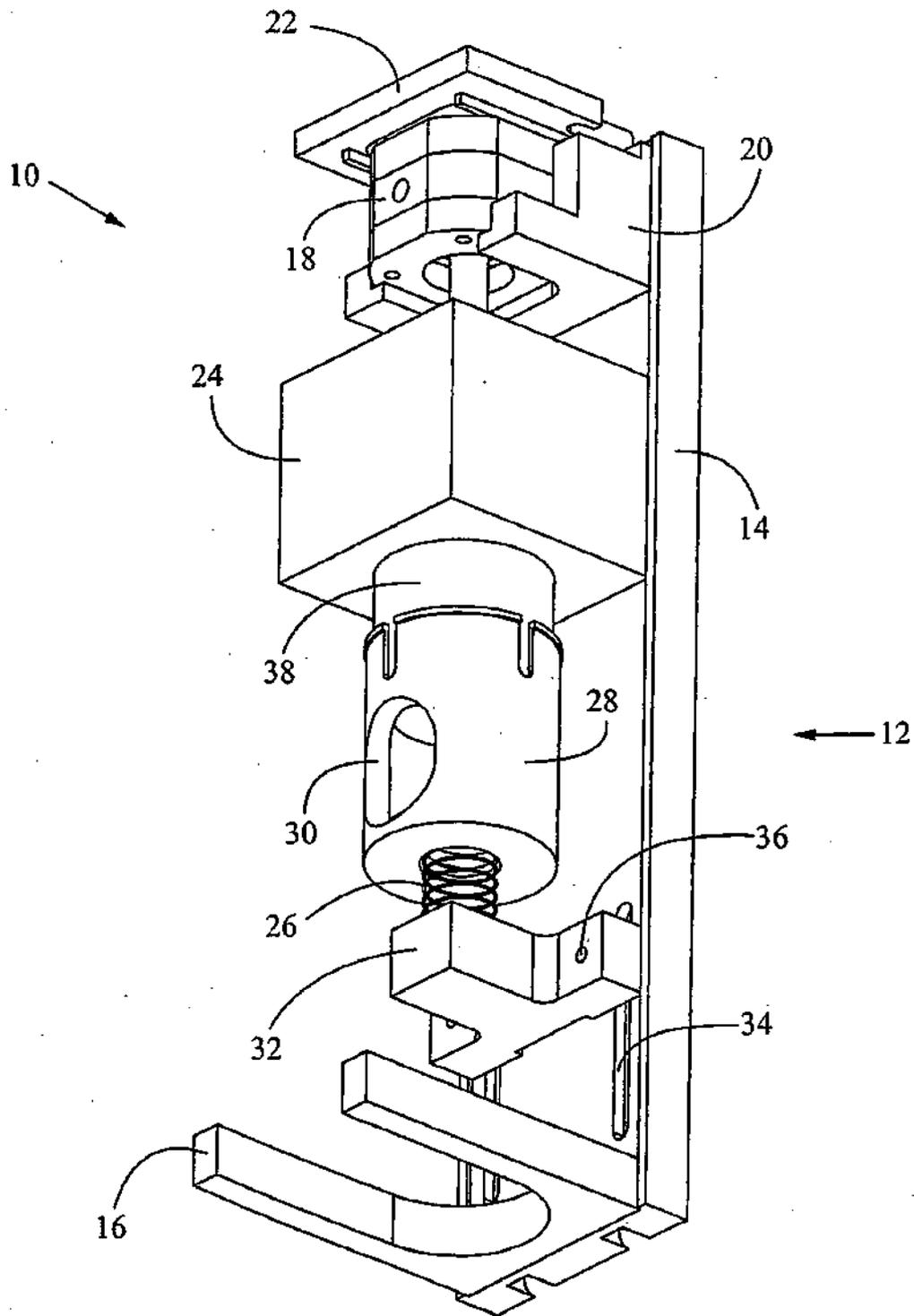


FIG. 1

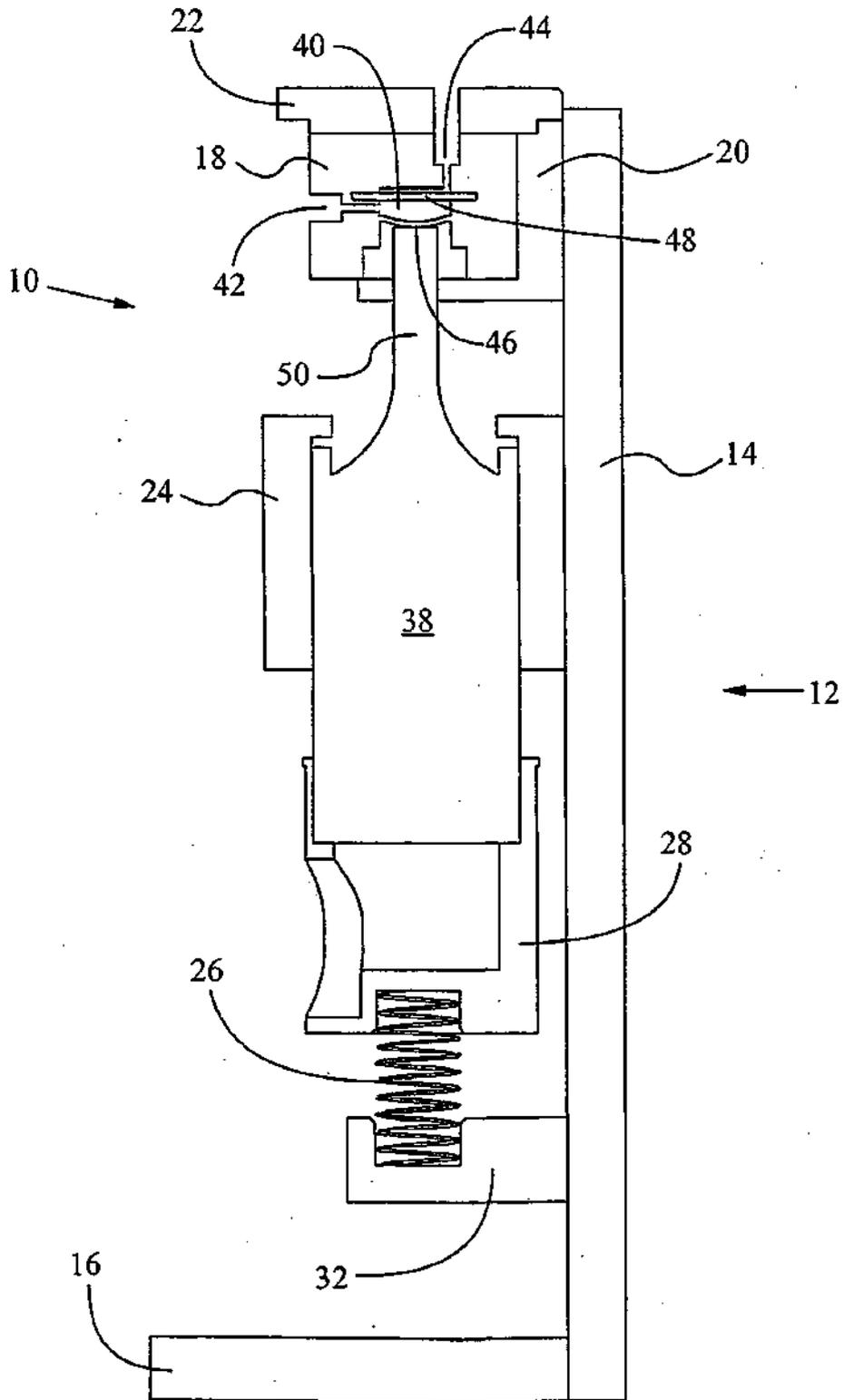


FIG. 2

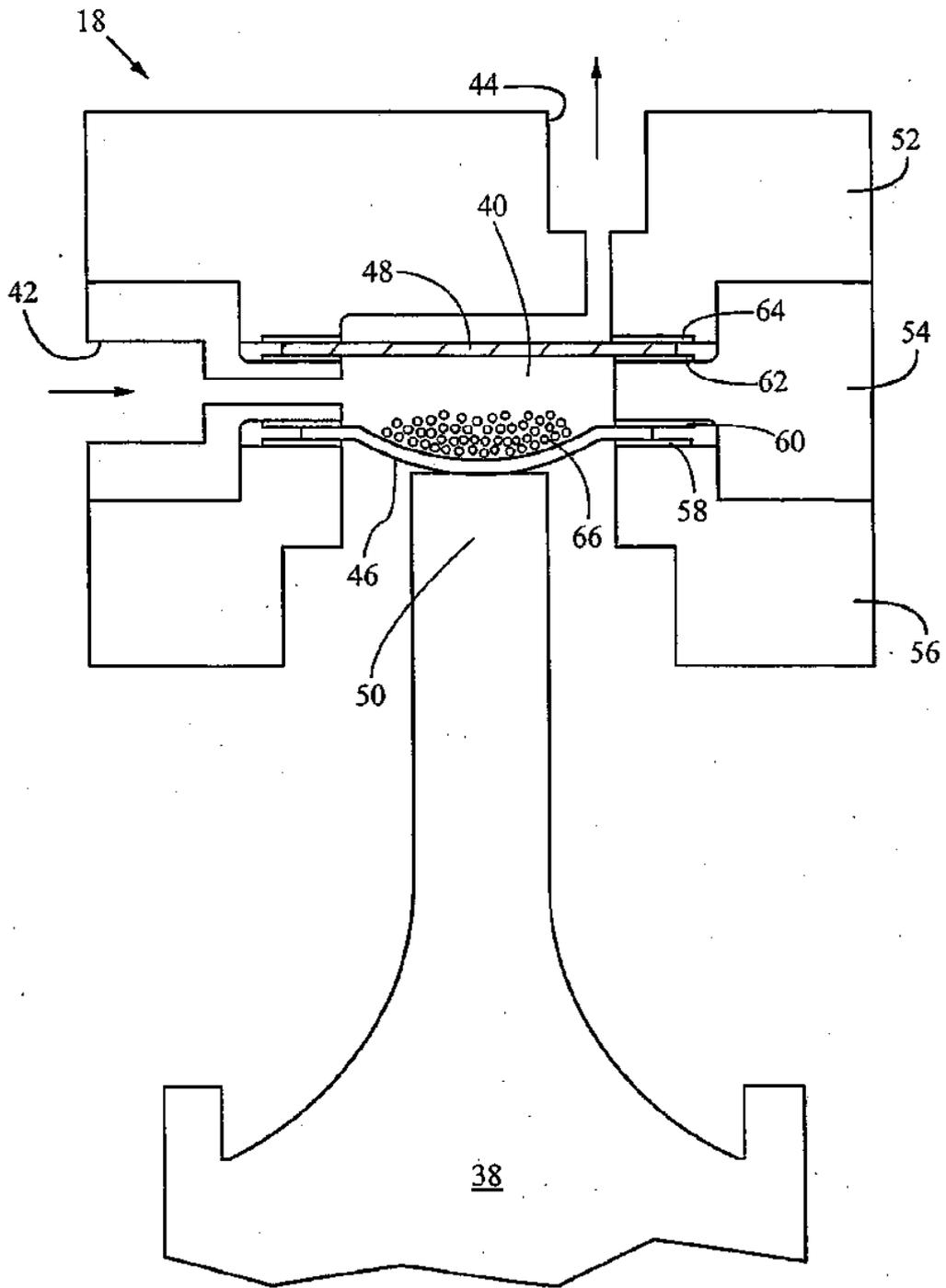


FIG. 3

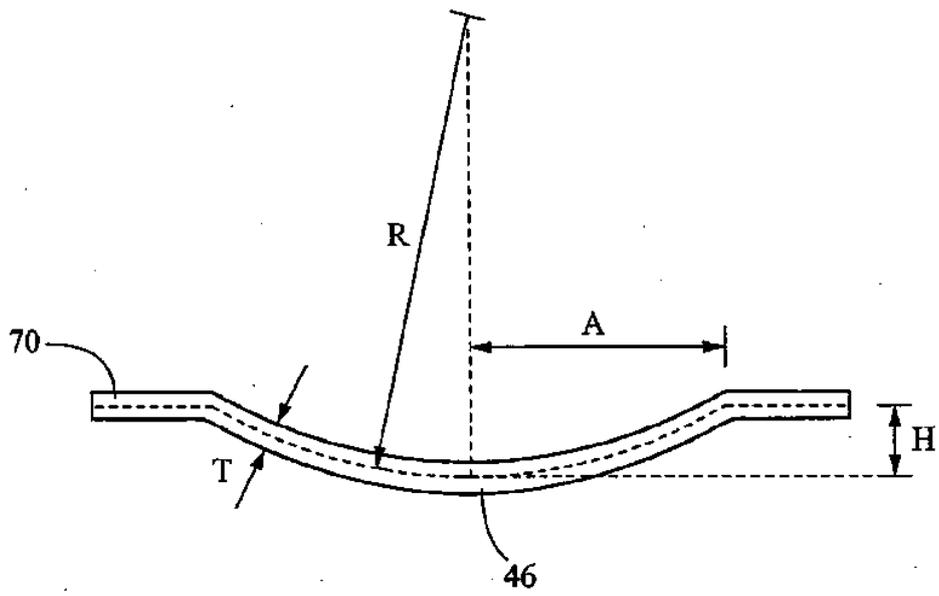


FIG. 4

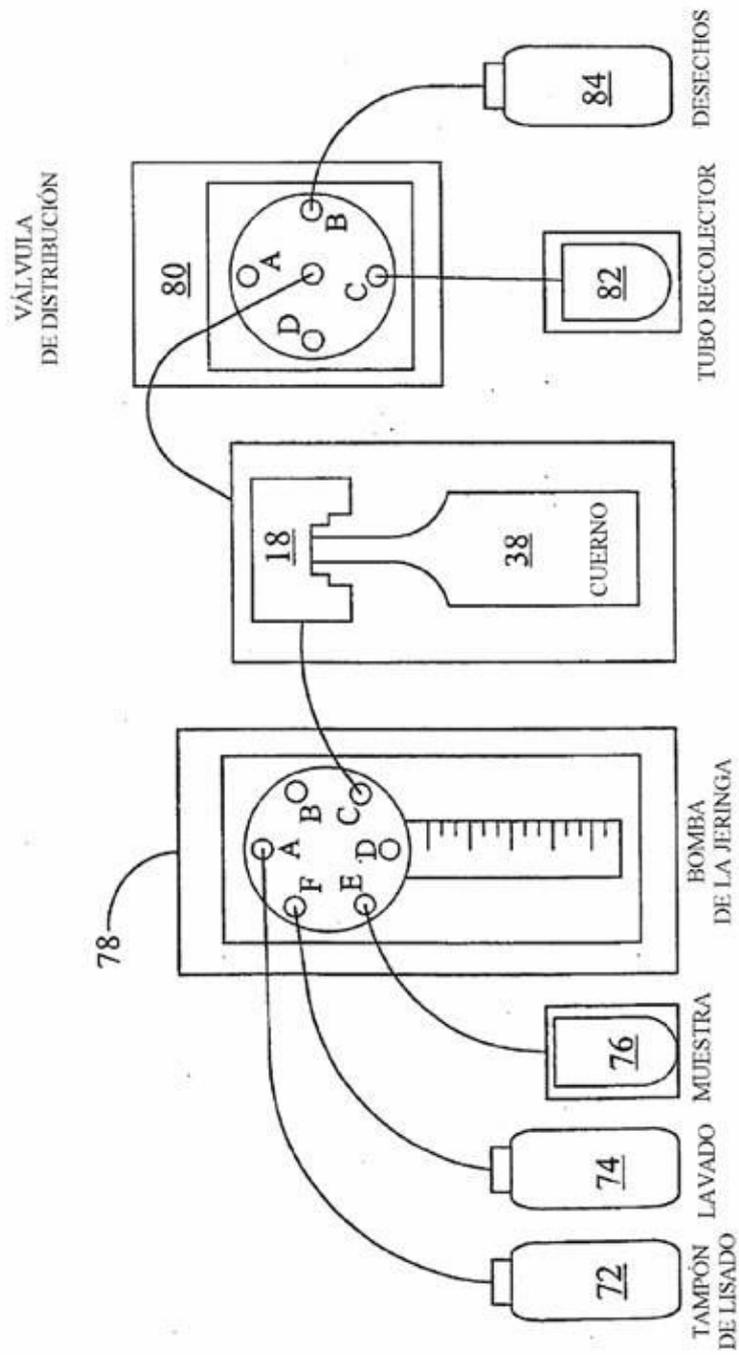


FIG. 5

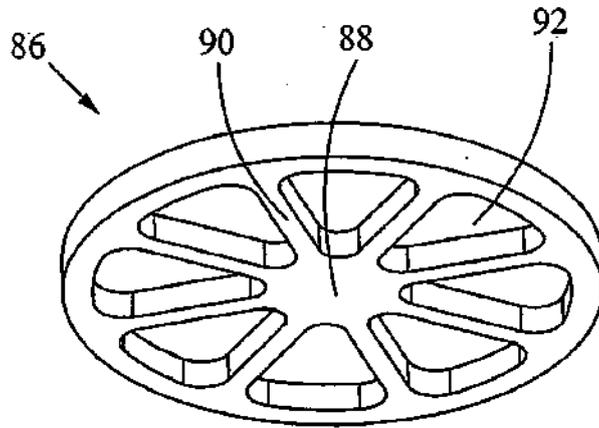


FIG. 6A

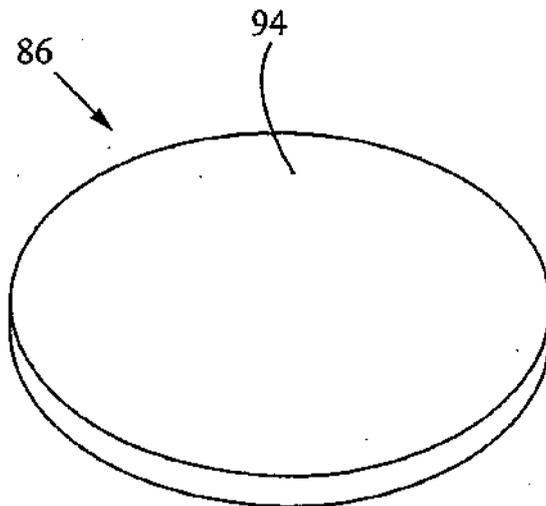


FIG. 6B

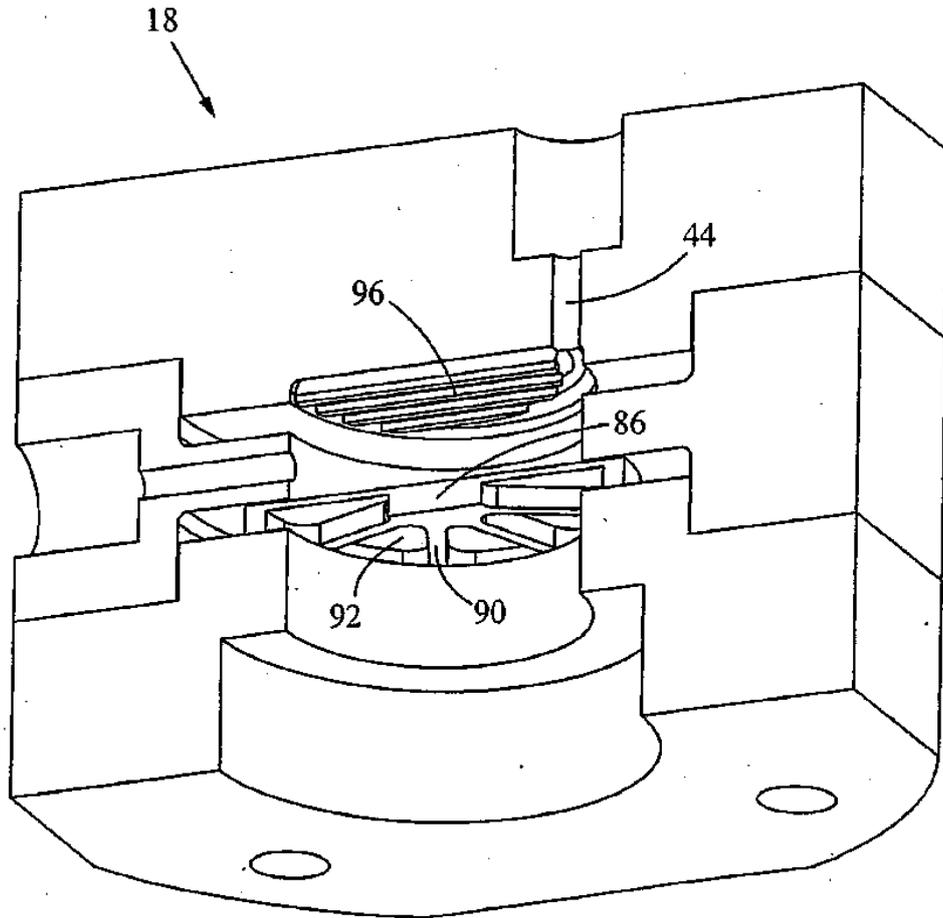


FIG. 7

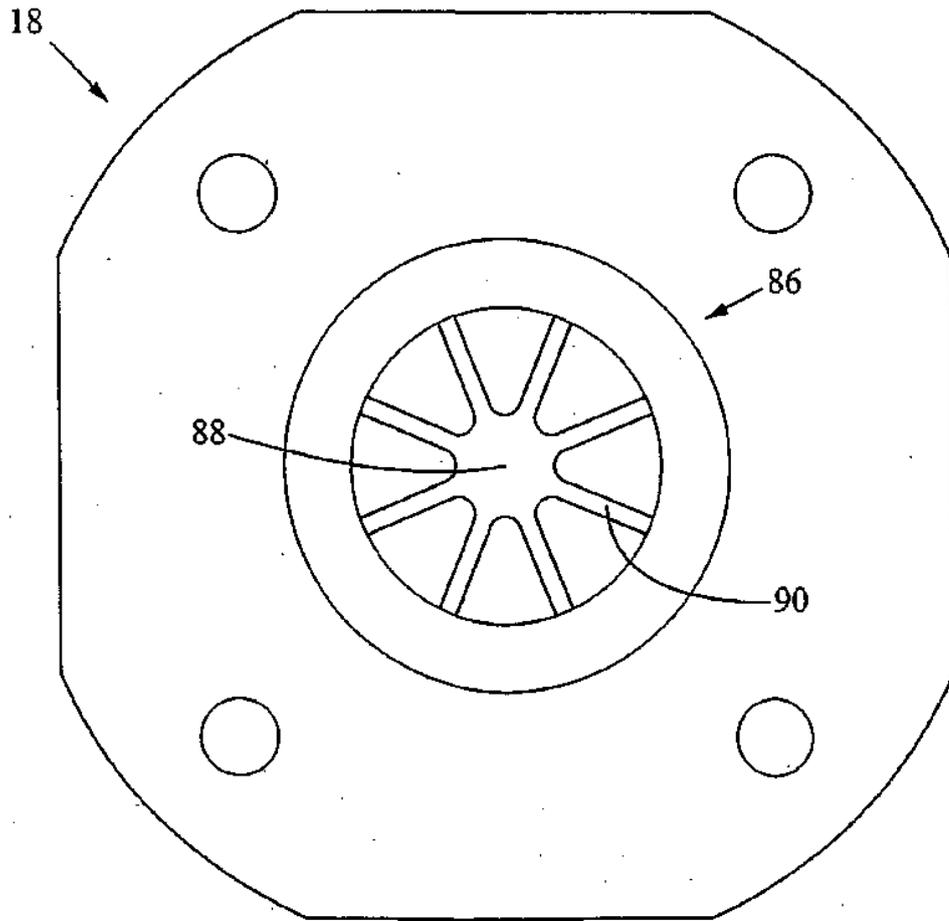


FIG. 8