

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 402**

51 Int. Cl.:

B01F 11/02 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2014** **PCT/EP2014/000451**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14139630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014** **E 14707322 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 2969169**

54 Título: **Aparato para aplicación de sonicación**

30 Prioridad:

15.03.2013 EP 13290065

22.08.2013 EP 13290200

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.03.2018

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

FELDEN, LUC;
LEHMANN, DAVID;
HOHNADDEL, MARISA y
JOUETTE, SEBASTIEN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 661 402 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 para aplicación de sonicación

La presente invención se relaciona con un aparato para aplicación de sonicación en muestras líquidas, preferentemente en el campo de biología, biología molecular, biotecnología, bioquímica, química general, industria de alimentos y bebidas, industria farmacéutica y en general para utilizar en aplicaciones de diagnóstico. La invención se relaciona además con un método de preparación de muestras para la detección de componentes celulares mediante el uso del aparato para aplicación de sonicación.

La sonicación se utiliza en los campos anteriores en una variedad de usos, tales como mezclado, solubilización, realización de reacciones químicas, homogenización de tejidos, operación y usos celulares, corte de moléculas biológicas tales como ADN como así también limpieza, soldadura plástica, etcétera. Normalmente, la sonicación en estos campos (excepto la soldadura plástica) se realizan en un baño de sonicación donde el agua transfiere la energía sónica de un transductor a una muestra o con sondas de sonicación donde una sonda de metal sumergida en la muestra aplica la energía sónica a la misma. El baño de sonicación está limitado por la cantidad de energía que transfiere a la muestra. La sonda de sonicación podría suministrar energía sustancial, pero está limitado a una muestra a la vez o a una muestra por sonda. Además, la inmersión de la(s) sonda(s) metálica(s) en la muestra necesariamente contamina la sonda metálica y requiere una limpieza costosa.

Las muestras a ser procesadas por sonicación pueden comprender bacterias, células, virus y otros materiales que contienen los ácidos nucleicos a ser ensayados en una solución adecuada que se agrega al recipiente de muestra en un volumen predeterminado.

La mayoría de los dispositivos actuales que realizan sonicación en muestras líquidas están limitados por el volumen mínimo de líquido de muestra que pueden tratar o procesar en un momento dado y por lo tanto proveen solamente un rendimiento limitado o sufren de otras desventajas, tal como el excesivo requerimiento de limpieza después del uso.

El documento US 2009/0151459 A1 divulga un sistema y un método de preparación de muestras ultrasónicas que incluye un recipiente de muestra cilíndrico conformado a partir de un material polimérico que tiene una pared que define una superficie lateral periférica externa y un volumen interno de entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 25 ml para contener el material de muestra. Se provee un conversor externo que convierte la electricidad de CA en vibraciones mecánicas en el rango ultrasónico y se provee una sonda ultrasónica que está en contacto con la superficie periférica externa del recipiente de muestra. La sonda ultrasónica está en comunicación con un conversor y transmite las vibraciones mecánicas a la pared del recipiente de muestra y por lo tanto al volumen interno para excitar y mezclar el material de muestra en el recipiente. La sonda tiene una porción de sonda que no se inserta en el recipiente de muestra pero que hace contacto íntimo con la pared lateral periférica del recipiente de muestra. Esta técnica previa es un sistema operado manualmente y está restringido a la sonicación de una sola muestra en un único recipiente de muestra a la vez.

El documento EP 0337690 A1 divulga otro método y aparato para preparar muestras de ácidos nucleicos que comprenden la sonicación no invasiva de la muestra contenida dentro de un recipiente de muestra que entra en contacto físico con una punta ultrasónica vibratoria alargada de un sonicador que resuena a una frecuencia de 40 kHz o mayor. El transductor ultrasónico está montado en un miembro de una estructura que a su vez está montada sobre una base ubicada dentro de un alojamiento. El transductor ultrasónico está montado sobre un cilindro neumático para controlar la fuerza de la punta ultrasónica contra una cubeta descartable que sirve como el recipiente para el líquido de muestra. La cubeta se mantiene contra la punta ultrasónica mediante un retén de fuerza que se acopla deslizablemente con la parte superior de la cubeta. Para mantener el contacto entre la punta ultrasónica y la cubeta, el aparato aplica una presión de entre 6×10^4 y 2×10^5 Nm⁻² mediante la activación del cilindro neumático. Este aparato también es un aparato de una muestra a la vez y por lo tanto no es apropiado para aplicaciones de alto rendimiento.

El documento US 2007/0238090 A1 divulga otro sistema y método para procesar una muestra de líquido biológico a utilizar en la lisis de virus o células biológicas que se analizan utilizando sistemas de ensayo biológicos. El volumen de muestra a ser tratado por este sistema está en el rango de entre aproximadamente 1 ml y 10 ml y la muestra se procesa aplicando presión y, ya sea, energía sónica o energía térmica a la muestra. Para este fin, el aparato tiene un vial específico que es cilíndrico y tiene una cámara interna para recibir la muestra. El vial tiene un extremo superior abierto en el que se inserta un tapón o pieza de inserción para sellar el extremo superior abierto y un tapón de retención para sujetar el tapón en el vial por medio de un acoplamiento roscado con la porción de extremo externo superior del vial. Una bobina de calentamiento rodea el extremo inferior del vial y un cabezal de sonicación con la forma de una punta alargada se coloca de tal modo que mira y se pone en contacto con una cara extrema de fondo plano del vial.

En una forma de realización adicional, el documento US 2007/0238090 A1 divulga un aparato en el que se multiplica la estructura anterior con un vial específico y el cabezal de sonicación alargado asociado de manera que se pueden procesar simultáneamente la pluralidad de muestras diferentes. Este sistema tiene una placa de múltiples pocillos que tiene una pluralidad de pocillos o cámaras, en que cada uno recibe una muestra de tamaño predeterminado, una placa de tapón que tiene una pluralidad de tapones o émbolos que sobresalen de una cara para el acoplamiento sellado en un respectivo pocillo alineado en la placa de múltiples pocillos y un mecanismo de trabado o de cerrojo para asegurar las dos placas entre sí cuando cada tapón está completamente insertado en el respectivo pocillo. Se provee un calentador para calentar la muestra en cada pocillo y un dispositivo ultrasónico que tiene una pluralidad de puntas alargadas en la misma cantidad que el número de pocillos en la placa, que se utiliza para aplicar ondas ultrasónicas a la muestra en cada pocillo, en que el dispositivo de sonicación de múltiples sondas está alineado con los extremos inferiores de los pocillos y se desplaza hacia los pocillos hasta que cada sonda entra en contacto con la cara extrema de fondo plano del respectivo pocillo alineado.

Esta forma de realización mejora el sistema en el sentido que permite el procesamiento simultáneo de un mayor número de muestras, pero es una disposición muy complicada ya que especialmente requiere una multiplicidad de puntas de sondas ultrasónicas.

Los documentos US6686195, US2011/151577 y W02006/119932 divulgan dispositivos para realizar la sonicación en muestras líquidas contenidas en viales de muestras. Todos estos dispositivos comprenden sondas ultrasónicas con cavidades en los que se ubican los viales de muestras. Ninguno de estos documentos divulga el uso de una estructura para ubicar múltiples viales de muestras en múltiples cavidades simultáneamente.

El objeto de la presente invención es proveer un aparato para aplicación de sonicación en múltiples muestras líquidas que sea apropiado para realizar simultáneamente la sonicación en una cantidad de muestras y que sea más simple y más robusto que los dispositivos anteriores. Además, un objeto de la invención es proveer un método de preparación de una muestra para la detección de componentes celulares por medio de una sonicación que pueda realizar de manera efectiva una lisis en una cantidad de muestras en un gran campo de aplicación.

Para resolver este problema, la presente invención provee un aparato para aplicación de sonicación en una muestra líquida, tal como se define en la reivindicación 1 y un método de preparación de una muestra para la detección de componentes celulares usando un aparato como el definido en la reivindicación 10. Las formas de realización preferidas del aparato y del método se definen en las reivindicaciones dependientes.

El método de preparación de una muestra para la detección de componentes celulares de acuerdo con la invención comprende los pasos de proveer la muestra en un vial de muestra, ubicar el vial de muestra en el aparato de la invención, realizar la sonicación en la muestra en el vial de muestra mediante el aparato usando los siguientes parámetros para efectuar una lisis de la muestra: aplicar un esfuerzo mecánico entre el vial de muestra y la sonda de entre 0,1 y 1 N/mm², aplicar una amplitud pico a pico de vibración de entre 2 y 10 μ m y aplicar una frecuencia de vibración de entre 20 y 100 kHz.

Una ventaja del aparato es que la lisis por medio de la sonicación se puede realizar en múltiples muestras de la serie de forma simultánea, en donde las muestras se reciben en viales o recipientes estándar que comúnmente se usan como productos consumibles en el campo de la bioquímica, química general, industria de alimentos y bebidas, industria farmacéutica y en general para utilizar en aplicaciones de diagnóstico, para llevar a cabo micro-reacciones en el rango de los microlitros. Estos viales típicamente comprenden tubos de laboratorio cónicos, los así denominados tubos para centrifuga cónicos o tubos de fondo redondo de 50 ml, tubos de microcentrifuga de 1,5 ml o 2 ml que se sostienen individualmente en la estructura o placas de microtitulación que combinan una serie de pocillos o tubos de ensayo en una placa integral y que típicamente están hechos de materiales plásticos que incluyen PP (polipropileno), PS (poliestireno), PC (policarbonato), PET (polietileno) o vidrio delgado.

Al permitir la sonicación de las muestras en tales viales o recipientes estándar, se pueden lisar de manera eficiente incluso cantidades muy pequeñas del líquido de muestra porque la sonda por medio de su disposición de cavidades que se corresponden con la serie de los respectivos viales de muestras, recibe y se pone en contacto con una superficie externa de la porción de fondo de cada uno de los respectivos viales de muestras. Comúnmente, la pequeña cantidad de líquido de muestra se recolecta en la porción de fondo de cada tal vial que típicamente es cónico o redondo o semiesférico. La cavidad de la sonda rodea esa porción de fondo no solo en la cara extrema inferior, sino también en una parte de la longitud por encima del extremo inferior y por lo tanto maximiza el área superficial y rodea todo el volumen de líquido. Por lo tanto, se puede transferir más energía a la muestra sin peligro de derretir o romper el tubo del vial y sin requerir el enfriamiento de los viales durante la sonicación. Además, la energía se distribuye más homogéneamente y se aplica al volumen completo de la muestra.

La sonicación indirecta desde el exterior del vial evita el contacto de la sonda ultrasónica con el líquido de muestra y el hecho de que una serie de múltiples viales de muestras se puede sonicar simultáneamente dentro de la estructura mediante la sonda ultrasónica común provee un resultado rápido y un alto rendimiento de grandes cantidades de

muestras a ser procesadas mientras que solo involucra una variación limitada entre las muestras en la serie.

Además, el aparato provee un sistema fácil de usar, ya que el soporte de la estructura para las muestras está diseñado para desplazarse en contacto con la sonda ultrasónica que puede permanecer inmóvil en el aparato, de modo que hay un movimiento definido por medio de un mecanismo mecánico simple que aumenta la seguridad para que los usuarios operen el aparato. La disposición mecánica simple provee la posibilidad de automatizar el transporte de la estructura que sostiene la serie de viales de muestras en la posición operativa que podría estar dentro de un alojamiento sustancialmente cerrado y sellado respecto del medio ambiente. Por lo tanto, el aparato no requiere pasos de manipulación manual durante el proceso y solamente una configuración de los viales en la estructura del aparato como paso preparatorio.

Como la sonda ultrasónica es un bloque integral que tiene una disposición o configuración de cavidades que se corresponden con la serie de los viales de muestras y está conformada como para recibir y ponerse en contacto respectivamente con una superficie externa de una porción de fondo de uno respectivo de los viales de muestras, es decir, como la forma de las cavidades imita la forma del fondo de los viales, el área de contacto con la superficie externa del vial se maximiza y la transferencia de energía ultrasónica se concentra en esa parte del vial donde se recolecta el líquido de muestra incluso en el caso en que solo se tratan cantidades de líquido de muestra muy pequeñas en el rango de los microlitros. De este modo, incluso muy pequeñas cantidades de líquido de muestra en el rango de entre 20µl y 1ml se pueden sonicar usando viales o recipientes estándar que están disponibles como productos consumibles en la industria.

La estructura de la sonda ultrasónica también provee la ventaja de que la energía de sonicación se distribuye homogéneamente con respecto a todos los viales de muestras en la serie, de modo que la desviación entre las cantidades de energía aplicada en las respectivas posiciones es pequeña y está asegurada la comparabilidad de los resultados a través de toda la serie.

Una forma de realización particularmente ventajosa es aquella en la que cada una de las múltiples cavidades en la sonda ultrasónica está configurada de modo de coincidir con diferentes configuraciones de fondo de al menos dos viales diferentes. Esto aumenta considerablemente la aplicación universal del aparato y la velocidad de sonicación porque no se requiere una modificación del aparato si se va a procesar de un lote al siguiente un tipo diferente de viales/recipientes.

Dado que la sonda ultrasónica está provista de la disposición de cavidades y conforma de otro modo un bloque integral para todos los viales de muestras a ser procesados en el aparato, la estructura es simple y la excitación de cada muestra de líquido es comparable dentro de rangos estrechos. Esto facilita el procesamiento de un mayor número de muestras y hace que los resultados sean más comparables. Además, la estructura simple de la sonda ultrasónica facilita la limpieza del aparato en los casos en que el líquido de muestra se derrama desde los viales/recipientes.

El método de preparación de la invención para detectar componentes celulares de una muestra mediante el uso del aparato de la invención y mediante la aplicación de la sonicación dentro de los rangos de parámetros de la reivindicación 11 provee un método de lisis universal que se puede aplicar a una gran variedad de células u organismos, tales como todas las bacterias, virus, esporas, levadura y moho dentro del mismo aparato y proceso. Esto reduce la cantidad de procedimientos diferentes que se deben implementar y documentar en un laboratorio y hace que los procedimientos sean más simples y comparables entre sí.

Estos y otros aspectos serán evidentes a continuación a partir de la descripción de una forma de realización preferida en relación con las figuras adjuntas. En estas figuras:

la Figura 1 muestra una vista esquemática en perspectiva de una forma de realización ejemplificativa del aparato de la presente invención,

la Figura 2 muestra el diagrama cinemático del aparato de la Figura 1,

la Figura 3 muestra una sonda en sección transversal con diferentes tipos ejemplificados de cavidades que representan diferentes formas de realización preferidas y vistas en corte ampliadas de las cavidades individuales dentro de la sonda ultrasónica del aparato de la invención.

La configuración básica del aparato de la invención se muestra en las Figuras 1 y 2. El aparato tiene una estructura 1 para sujetar una serie de viales de muestras 2 y una sonda ultrasónica 3 con una disposición de cavidades 4 que se corresponde con la serie de viales de muestras y que está adaptada para recibir y ponerse en contacto respectivamente con una superficie externa de una porción de fondo 2a de uno respectivo de los viales de muestras cuando la sonda y la estructura están alineadas y están puestas en una posición de trabajo que se muestra en la Figura 1. La sonda 3 está cooperando con un conversor que produce la vibración ultrasónica y la transmite a la

sonda.

5 La estructura 1 está soportada de modo que es desplazable en la dirección de los ejes centrales y está preferentemente desviada elásticamente en una dirección hacia los miembros empujadores 6 de un mecanismo de empuje 7 de un contra-soporte 5 para aplicar una fuerza de sujeción o de contacto. Un mecanismo de movimiento (que no se muestra) preferentemente se provee en el aparato para desplazar la estructura entre una posición fuera de un alojamiento del aparato y una posición dentro del alojamiento que se alinea con la sonda ultrasónica. Por lo tanto, un operador solo tiene que colocar los viales con las muestras en la estructura o colocar toda la estructura con los viales en el mecanismo de movimiento. Estos movimientos se pueden realizar manualmente pero también se pueden automatizar, por ejemplo, mediante manipuladores o robots dedicados o programables. Después del inicio del proceso (es decir, al presionar un botón de "inicio"), la estructura se desplaza automáticamente en el alojamiento, preferentemente mediante un movimiento horizontal, y la sonicación se realiza mientras el operador está protegido del proceso. Después de la sonicación prefijada, la estructura se desplaza nuevamente fuera del alojamiento por medio del mecanismo de movimiento para una manipulación posterior de los viales.

15 El contra-soporte 5 tiene una disposición de miembros de empuje que se corresponde con la serie de los viales de muestras y está adaptado para respectivamente aplicar una fuerza a una parte superior de uno respectivo de los viales de muestras 2 de forma de empujar la porción de fondo de cada vial a un contacto estrecho con la cavidad asociada 4 de la sonda 3 con una presión definida (fuerza por área de superficie). La presión es lo suficientemente alta como para que se transfiera un máximo de energía ultrasónica a la muestra en el vial y no al vial en sí mismo de modo de evitar la fusión del material del vial (es decir, el polipropileno) en la interfase. Una pérdida de contacto crearía de hecho una cizalladura en la interfase que aumentaría la temperatura. Por otro lado, una presión de contacto demasiado alta exigiría demasiada potencia del convertidor de potencia para mantener una amplitud de vibración constante y podría crear tensión en el borde del vial, lo que podría tener las mismas consecuencias negativas que la pérdida de contacto.

25 En el aparato, la fuerza para crear la presión de contacto se podría crear de varias formas diferentes. En la forma de realización preferida mostrada, los miembros de empuje preferentemente tienen la forma de varillas de empuje 6 que están dispuestas y mantenidas en una plataforma común 8 para aplicar la fuerza a la porción superior de los respectivos viales asociados y para desplazarse en conjunto por medio de un mecanismo de accionamiento 9. Es factible una configuración diferente de los miembros de empuje y un lugar diferente en el que se introduce la fuerza en los viales. En una forma de realización preferida (que no se muestra), la serie de los miembros de empuje es intercambiable para alojar una serie diferente de los viales de muestras y/o los viales de muestras con una configuración diferente.

Las varillas de empuje 6 están preferentemente diseñadas de tal manera que la fuerza es ajustable y/o las varillas de empuje son desviadas elásticamente hacia los viales. Esto se puede lograr con muelles pretensados cuya tensión previa es ajustable para ajustar la fuerza aplicada al respectivo vial.

35 Se provee el mecanismo de posicionamiento 9 para desplazar selectivamente la plataforma 8 y de ese modo acoplar la disposición de los elementos de empuje 6 con los viales. Este mecanismo de posicionamiento 9 comprende la plataforma 8 para sostener la serie de elementos de empuje 6. La plataforma 8 es sostenida de manera que es al menos desplazable en la dirección hacia la sonda 3 y desde la misma y un mecanismo de accionamiento 9 desplaza la plataforma 8 de forma repetida y alternada entre estas posiciones y aplica la misma fuerza de sujeción que puede comprender un sistema de leva/seguidor con un engranaje y un motor de accionamiento, tal como se muestra en la Figura 2. Otros mecanismos de accionamiento son posibles e incluyen la actuación de un accionamiento eléctrico, hidráulico o neumático. Las varillas de empuje 6 también podrían ser desviadas por cilindros eléctricos o hidráulicos (que no se muestran).

45 La disposición en el aparato tiene en general tal forma que los ejes centrales de las cavidades y los miembros de empuje asociados están alineados y son concéntricos con los viales de muestras asociados en la serie, al menos cuando se aplica la fuerza y se inicia la sonicación.

50 Las cavidades 4 de la sonda ultrasónica 3 de tipo bloque integral del aparato tal como se muestran, por ejemplo, en la Figura 3 son un aspecto importante de la invención. Las cavidades están conformadas para coincidir, al menos en cierta medida, con una configuración de fondo de la porción de fondo 2a de los viales 2 a ser utilizados en la serie, en donde las cavidades son preferentemente simétricas de modo rotacional alrededor de un eje central y en función del tipo de vial utilizado en el aparato, son preferentemente, ya sea, hemisféricas o cónicas, tal como se muestra en la Figura 3a. Por lo tanto, el aparato se puede usar en conexión con tubos o viales o recipientes de reacción estándar comunes que se podrían agrupar en viales/recipientes pequeños que tienen un volumen o tamaño nominal típico en el rango de entre 1,5 ml y 2 ml, es decir, los llamados vasos Eppendorf, que típicamente tienen una cubierta a presión o sello cónico o sello de silicona, o viales/recipientes grandes que típicamente tienen el volumen nominal en el rango de entre 15 ml y 50 ml y que tienen una tapa a presión o roscada y que están disponibles, por ejemplo, como tubos para centrifuga cónicos de 50 ml o placas de 96 pocillos con pocillos de 200 µl.

Los viales pueden ser recipientes individuales, tal como se describió anteriormente o placas de microtitulación que combinan una serie de pocillos o tubos de ensayo en una placa integral. Todos estos recipientes están típicamente hechos de materiales de plásticos, tal como PP (polipropileno), PS (poliestireno), PC (polycarbonato), PET (polietileno) o de vidrio delgado. Los tipos de viales pequeños tienen en general un extremo de punta hemisférica pequeña y los tipos de viales más grandes tienen un extremo inferior cónico, pero son posibles diferentes configuraciones. Como se muestra en la Figura 3a las cavidades de la sonda ultrasónica de la invención imitan estas configuraciones de fondo de los viales que típicamente se usan en el ambiente de laboratorio. De este modo, se maximiza el área de contacto con la superficie externa en la sección de fondo y el área de contacto no solo está restringida a la superficie de fondo axial sino que se extiende más hacia arriba de modo que el área de contacto entre la cavidad y el vial rodea el extremo de fondo inferior donde se acumulan los pequeños volúmenes de líquido de muestra.

En una forma de realización particularmente preferida que se muestra en la Figura 3b, cada cavidad está configurada de modo de coincidir con diferentes configuraciones de fondo de al menos dos o incluso más viales diferentes. En la Figura 3b se muestra una tal estructura que combina el contorno semiesférico en la porción de fondo de los tipos de viales pequeños con la configuración cónica que es adyacente al extremo de fondo en una cavidad de los tipos de viales grandes. Aquí, también, se pueden implementar diferentes configuraciones que proveen la máxima área de contacto con las diferentes configuraciones.

El aparato de la invención se puede aplicar universalmente a una gran cantidad de tareas de lisis en muestras líquidas en el campo de biología, biología molecular, biotecnología, bioquímica, química general, industria de alimentos y bebidas, industria farmacéutica y en general para utilizar en aplicaciones de diagnóstico. Como los viales/recipientes de muestras comunes, tal como se describió anteriormente, se pueden alojar en el aparato y como en el aparato se pueden configurar los parámetros del proceso de sonicación tales como la fuerza de retención en los viales de muestras, la amplitud de vibración pico a pico y la frecuencia como así también el tiempo de sonicación, se puede llevar a cabo una amplia variedad de aplicaciones, tales como mezcla, sonoquímica y preparación de muestras para diagnóstico.

Un efecto particularmente ventajoso se obtiene mediante el uso del aparato descrito anteriormente en un método de preparación de una o más muestras para la detección de componentes celulares (por ejemplo, analito celular, proteínas, ácido nucleico (AN), etcétera) que entonces comprende los pasos de proveer cada muestra en un vial de muestra separado, ubicar los viales de muestras en el aparato, realizar la sonicación simultáneamente en las muestras en los viales de muestras por medio del aparato usando los siguientes parámetros para efectuar una lisis de las muestras:

- aplicar una tensión mecánica de retención entre los viales de muestras y la sonda de entre 0,1 y 1 N/mm² (preferentemente de 0,26 +/- 0,05 N/mm² en tubos para microcentrífuga de 1,5 ml y de 0,1 +/- 0,01 N/mm² en tubos para centrífuga cónicos de 50 ml),

- aplicar una amplitud de vibración pico a pico de entre 2 y 10 μ m (preferentemente de 4 μ m para tubos pequeños y de 10 μ m para tubos grandes), y

- aplicar una frecuencia de vibración de entre 20 y 100 kHz (preferentemente de 20 kHz +/- 100 Hz para tubos pequeños y grandes).

El tiempo de sonicación es de aproximadamente 3 minutos para tubos pequeños y grandes. El método puede romper todas las bacterias, virus, esporas, levaduras y moho sin destruir su NA cuando se realiza en una solución amortiguadora apropiada, es decir, solución amortiguadora de guanidina.

Como resultado se obtuvo que los rangos de parámetros definidos anteriormente cubren una amplia variedad de aplicaciones de sonicación que usan el aparato de la invención. Se puede proveer un controlador en el aparato que permite el ajuste de los respectivos valores dentro de los rangos a través de una interfaz de operador apropiada y que controla los componentes en el aparato de modo que la sonicación se efectúa dentro de los valores fijados. Además, el controlador también puede efectuar la transferencia automática de la estructura hacia el aparato y desde el mismo, tal como se describió anteriormente mediante la actuación de una manera predefinida de los respectivos mecanismos de accionamiento en el aparato.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Demostración de la eficiencia de la lisis en microorganismos

1.1. Protocolos experimentales

Preparación y lisis de las cepas

Para cada microorganismo ensayado, unas pocas CFU (colony forming units, unidades formadoras de colonias) de cultivos de placas se resuspenden en un diluyente de sal de peptona con un valor de densidad óptica definido. Se realizaron diez veces diluciones en serie.

- 5 Luego, se adicionó 10^4 CFU en solución amortiguadora de lisis (clorhidrato de guanidina M, NLS 0,5%, 5 mM de Tris pH 8, 0,5 mM de EDTA). El volumen total de la solución de lisis es de 500 μ l. Se realizaron 10 ensayos de replicación.

- 10 Las muestras se sonicaron con el aparato de acuerdo con la presente invención en tubos resistentes a la sonicación de 1,5 ml (Eppendorf Safe-Lock Biopur) durante aproximadamente 3 minutos. Se realizó inmediatamente un paso de purificación de ADN para aislar el ADN de los microorganismos en una solución amortiguadora de elución compatible con PCR (polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real.

Purificación de ADN

La purificación magnética de ADN se realizó para purificar el ADN de microorganismos utilizando perlas magnéticas. Se purificaron 15 muestras simultáneamente utilizando el instrumento KingFisher (ThermoScientific ref. 5400050) y el conjunto de elementos MilliPrep (Merck Millipore ref. MPRPMYC48).

- 15 Después se transfirieron los eluatos a tubos de 1,5 ml y se centrifugaron durante 90 s a 10000 g. Si era necesario, las muestras se almacenaron a -20 °C y se descongelaron antes de realizar la amplificación específica de ADN en tiempo real.

Detección y amplificación específica de ADN en tiempo real

- 20 Se realizaron ensayos de PCR SYBR Green en tiempo real específico excepto para *L. monocytogenes* y *E. coli*. Se preparó una mezcla PCR de 15 μ l por reacción con el conjunto de elementos QuantiTect® SYBR® Green PCR (Qiagen) concentrado 2X y 0,5 μ M de iniciadores específicos. Luego, se agregaron 10 μ l de cada muestra a cada pocillo. En cada ejecución se incorporaron controles negativos (10 μ l de agua) y controles positivos (1-100 ng del gDNA de microorganismos ensayados). Se realizaron dos ensayos de replicación de PCR por muestra purificada.

- 25 Las placas de PCR (placa Twintec, Eppendorf) se sellaron (película Microseal®, Bio-rad) y se centrifugaron durante 2 minutos a 1700 rpm. Los ensayos de PCR se realizaron en el instrumento Mastercycler eppgradient realplex² (Eppendorf).

- 30 Para *E. coli*, se realizó un ensayo de PCR TaqMan en tiempo real específico. Se preparó una mezcla PCR de 15 μ l por reacción con el conjunto de elementos QuantiFast™ PCR concentrado 2X (Qiagen), 0,1 μ M de iniciador específico y 0,08 μ M de una sonda específica. Luego, se agregaron 10 μ l de cada muestra a cada pocillo con controles negativos y positivos. Se realizaron dos réplicas de PCR por muestra purificada. Las placas y los ensayos de PCR se realizaron como se describió anteriormente.

- 35 El ensayo de *L. monocytogenes* se realizó utilizando el conjunto de elementos de detección de *Listeria Monocytogenes* de FoodProof® (Biotecon Diagnostics). Se realizaron dos réplicas de PCR por muestra purificada. La placa de PCR (FrameStar®, 4titude) se selló (QPCR Adhesive Clears, 4titude) y se centrifugó durante 2 minutos a 1700 rpm. El ensayo de PCR se realizó en el instrumento Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies).

1.2. Resultados

Cepa	Valor de ciclo umbral $\pm$ desviación estándar	Cantidad de CFU lisadas
<i>E. faecalis</i>	21,72 $\pm$ 0,508	8379
<i>S. aureus</i>	24,87 $\pm$ 0,384	9675
<i>S. agalactiae</i>	26,78 $\pm$ 0,340	16 380
<i>S. epidermidis</i>	25,33 $\pm$ 0,205	10 870
<i>L. monocytogenes</i>	29,13 $\pm$ 0,458	7664

<i>P. aeruginosa</i>	21,03 ± 0,192	16 550
<i>S. enterica</i>	23,23 ± 0,317	9113
<i>E. coli</i>	24,23 ± 0,194	7790
<i>P. acnes</i>	23,97 ± 0,204	5280
<i>C. sporogenes</i>	27,23 ± 0,599	5880
Esporas de <i>G. stearothermophilus</i>	27,82 ± 0,479	10 110
<i>Z. bailii</i>	22,39 ± 0,77	12 830
<i>C. albicans</i>	21,66 ± 0,456	7976
<i>C. neoformans</i>	25,46 ± 0,503	9328
<i>S. cerevisiae</i>	28,78 ± 0,824	9250
Esporas de <i>A. brasiliensis</i>	21,56 ± 0,563	5100

Los datos muestran que la sonicación se puede considerar como un método de lisis eficiente en bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas (incluidas bacterias anaeróbicas), esporas de bacterias, levaduras y esporas de mohos.

5 Ejemplo 2: Demostración de la linealidad de lisis

2.1. Protocolos experimentales

La linealidad de la lisis usando el aparato de sonicación de acuerdo con la presente invención se ensayó adicionando y lisando 10/100/1000/10 000 CFU de los microorganismos ensayados (preparados tal como se describió anteriormente). Se realizaron 5 réplicas por concentración ensayada. La purificación y la amplificación de ADN se realizó tal como se describió anteriormente.

2.2. Resultados

Cepa	Valor de ciclo umbral ± desviación estándar	CFU lisadas	R ²
<i>S. enterica</i>	33,49 ± 0,98	8	0,9648
	30,97 ± 0,53	116	
	27,32 ± 0,33	1160	
	23,68 ± 0,26	11 600	
<i>S. aureus</i>	33,22 ± 1,065	13	0,9175
	31,5 ± 1,064	157	
	28,40 ± 0,556	1570	
	24,91 ± 0,413	15 700	

ES 2 661 402 T3

<i>C. albicans</i>	29,55 ± 1,226	9	0,9547
	26,63 ± 0,868	86	
	23,85 ± 0,405	860	
	20,68 ± 0,425	8602	
<i>A. brasiliensis</i>	36,99 ± 1,022	16	0,9866
	32,23 ± 0,597	92	
	26,29 ± 0,440	920	
	20,69 ± 0,772	9200	
<i>P. aeruginosa</i>	31,36 ± 0,937	12	0,9836
	27,51 ± 0,264	102	
	24,24 ± 0,150	1017	
	20,68 ± 0,215	10 166	

Los datos presentados en la tabla anterior muestran que la lisis de los microorganismos analizados es lineal utilizando el instrumento de sonicación.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para aplicación de sonicación en muestras líquidas, que comprende:

una estructura (1) para sostener una serie de viales de muestras (2),

una sonda ultrasónica (3) con una disposición de cavidades (4) que se corresponde con la serie de viales de muestras (2) y que está adaptada para recibir y se pone respectivamente en contacto con una superficie externa de una porción de fondo (2a) de uno respectivo de los viales de muestras (2), y

un contra-soporte (5) con una serie de miembros de empuje (6) que se corresponden con la serie de viales de muestras (2) y que está adaptado para aplicar respectivamente una fuerza a uno respectivo de los viales de muestras (2) como para empujar la porción de fondo (2a) de cada vial (2) en contacto con la cavidad asociada (4) de la sonda (3).

en donde la estructura (1) soporta de modo desplazable y se desvía elásticamente en una dirección hacia los miembros de empuje (6).
2. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los miembros de empuje tienen forma de varillas de empuje (6) y están dispuestos para aplicar la fuerza a una porción superior de los respectivos viales asociados (2).
3. El aparato de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las varillas de empuje (6) están soportadas de tal manera que la fuerza es ajustable y/o las varillas de empuje son desviadas elásticamente hacia los viales (2).
4. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se provee un mecanismo de posicionamiento (7) para acoplar selectivamente los miembros de empuje (6) con los viales (2).
5. El aparato de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el mecanismo de posicionamiento (7) comprende una plataforma (8) para sostener la serie de miembros de empuje (6), en que dicha plataforma (8) es soportada de modo de ser al menos desplazable en la dirección hacia la sonda (3) y lejos de la misma y que incluye un mecanismo de accionamiento para desplazar de forma alternada la plataforma (8) en esta dirección.
6. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende un mecanismo de movimiento para desplazar la estructura (1) entre una posición en el exterior de un alojamiento del aparato y una posición en el interior del alojamiento alineada con la sonda ultrasónica (3).
7. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las cavidades (4) están conformadas para coincidir con una configuración de fondo de los viales (2) en la serie, en donde las cavidades (4) son preferentemente simétricas de modo rotacional alrededor de un eje central, más preferentemente hemisféricas o cónicas.
8. El aparato de acuerdo con la reivindicación 7, en donde cada cavidad (4) está configurada de modo de coincidir con diferentes configuraciones de fondo de al menos dos viales (2) diferentes y preferentemente tiene una porción de fondo redondeada (4a) y una porción periférica cónica (4b).
9. El aparato de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde al menos la porción de la sonda (3) que contiene las cavidades (4) es intercambiable para alojar una serie diferente de viales de muestras (2) y/o viales de muestras (2) con diferente configuración de fondo.
10. Un método para preparar una muestra para la detección de componentes celulares, que comprende:

proveer la muestra en un vial de muestra (2),

colocar el vial de muestra (2) en el aparato tal como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,

realizar la sonicación en la muestra en el vial de muestra (2) mediante el aparato que utiliza los siguientes parámetros para efectuar una lisis de la muestra:

aplicar una tensión mecánica entre el vial de muestra y la sonda de entre 0,1 y 1 N/mm²,

aplicar una amplitud de vibración pico a pico de entre 2 y 10 μ m, y aplicar una frecuencia de vibración de entre 20 y 100 kHz.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde se proveen múltiples muestras en múltiples viales de muestras en la serie y la sonicación se realiza simultáneamente en el aparato en las múltiples muestras en la serie.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde la(s) muestra(s) se provee(n) en un volumen de muestra de entre 20 μ l y 1 ml en vial(es) de muestra(s) con un volumen nominal de entre 200 μ l y 50 ml.

5 13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, 11 o 12, en donde el(los) vial(es) de muestra(s) utilizados para recibir la(s) muestra(s) son tubos de laboratorio estándar, preferentemente tubos de laboratorio cónicos, los así denominados tubos para centrífuga cónicos o tubos de fondo redondo de 50 ml, los así denominados tubos para microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml, o la estructura que incluye la serie de viales de muestras es una placa de microtitulación o de múltiples pocillos, preferentemente hecha de material plástico que incluye PP, PS, PC y PET.

10

Fig. 1

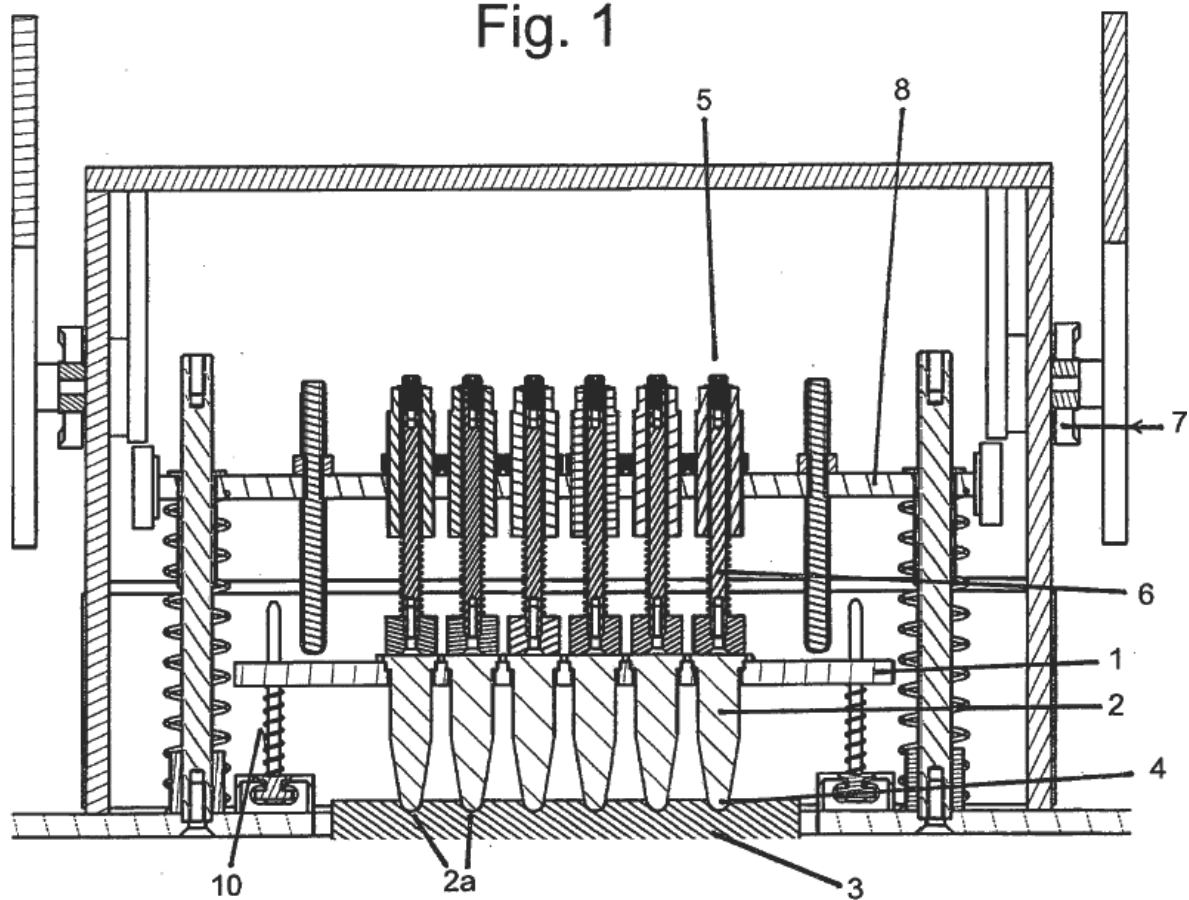


Fig. 2

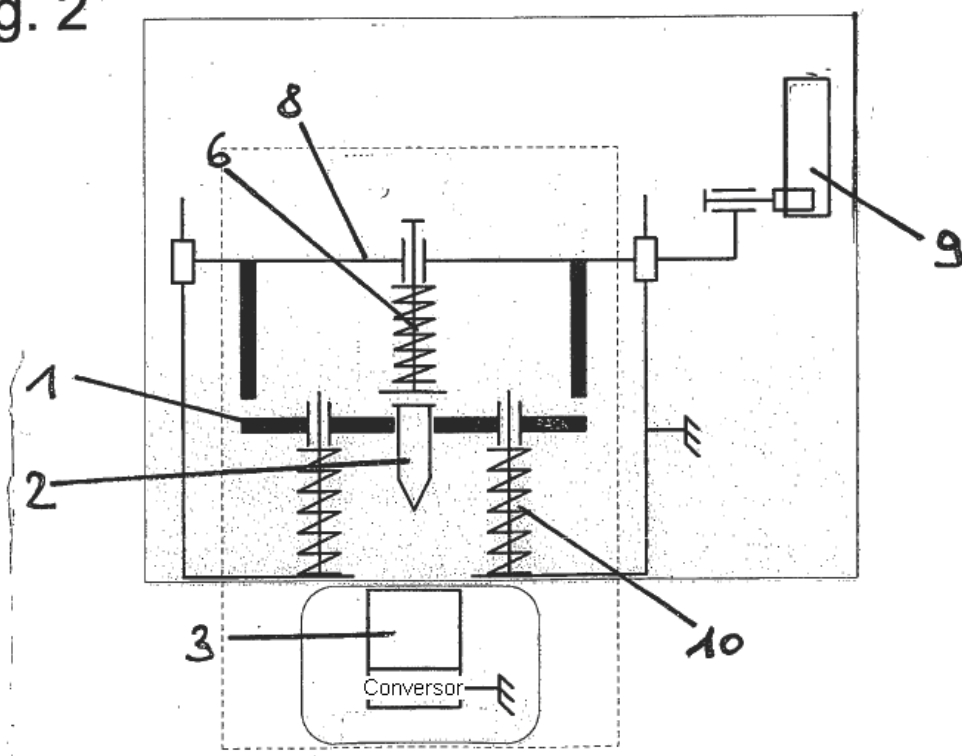


Fig. 3

