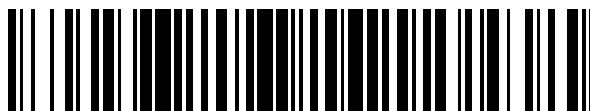


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 146**

51 Int. Cl.:

**B65D 90/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/US2013/027068**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13126526**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13751876 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2817247**

54 Título: **Recipientes para la agitación de muestras líquidas y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**22.02.2012 US 201261601842 P**

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

**30.07.2018**

73 Titular/es:

**T2 BIOSYSTEMS, INC. (100.0%)  
101 Hartwell Avenue  
Lexington, Massachusetts 02421, US**

72 Inventor/es:

**SUCHOCKI, ADAM;  
AUDEH, MARK, JOHN;  
BLANCO, MATTHEW;  
CHEPIN, JAMES, FRANKLIN;  
DEMAS, VASILIKI;  
FRITZEMEIER, MARILYN, LEE;  
LOWERY, THOMAS, JAY;  
MIN, MICHAEL;  
NEELY, LORI, ANNE;  
RITTERSHAUS, CHARLES, WILLIAM;  
WANG, HWA-TANG y  
WELLMAN, PARRIS, S.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 677 146 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

Recipientes para la agitación de muestras líquidas y métodos de uso de los mismos

**Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas**

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. núm. 61/601.842, presentada el 22 de febrero de 2012.

**Antecedentes de la invención**

10 Los ensayos bioquímicos y biológicos moleculares estándar a menudo necesitan que una muestra líquida se mezcle y/o que sus contenidos celulares se lisen en una o más etapas en el ensayo. Anteriormente, para mezclar una muestra líquida, la muestra se coloca en un recipiente, que se coloca entonces en un dispositivo de agitación. El dispositivo de agitación agita el recipiente, mezclando así los contenidos líquidos del recipiente. El lisado de células en una muestra líquida puede implicar la adición de partículas rígidas, del tamaño de micras, a la muestra antes de la etapa de mezcla. En este proceso de agitación, conocido como ruptura con perlas, las partículas rígidas alteran la pared celular con colisiones productivas, lisando así las células.

15 Como un ejemplo de dicha técnica anterior, el documento EP 0 224 650 A2 describe un montaje de recogida de sangre que incorpora un recipiente de micro-recogida, en donde se proporciona un miembro que induce el flujo sanguíneo alargado separado o integral que sirve como una guía para inducir el paso del flujo sanguíneo a lo largo de una superficie, y como un puente, que induce el flujo sanguíneo a través de un punto de transición entre dos partes en un montaje de recogida de sangre. Miembros representativos que inducen el flujo sanguíneo incluyen, por ejemplo, una disposición en barra o tira alargada incorporada en un montaje de micro-recogida de sangre de tal forma que la sangre recogida se dirija desde el colector de forma continua al recipiente de recogida asociado. Como una característica adicional, en el tubo de recogida de sangre, una vez que una muestra se recoge ahí y el tubo se cierra, la invención induce el flujo de la muestra hacia adelante y hacia atrás para mejorar la mezcla de la muestra recogida con otros componentes en el tubo.

20 Como ejemplo adicional, el documento US 7 377 027 B2 describe un aparato que puede ser parte de un sistema automatizado para procesar múltiples especímenes con base líquida, y un método para manejar un recipiente que tiene una cubierta extraíble, por ejemplo, un vial para contener un espécimen fluido biológico. El recipiente puede tener en él un elemento interno que está acoplado de forma extraíble a la cubierta, como un montaje para procesar el espécimen en el recipiente. El método implica aplicar una fuerza externa al recipiente tapado suficiente para liberar el elemento interno de la cubierta, y después quitar la cubierta del recipiente, en donde la fuerza externa puede ser una fuerza de aceleración aplicada al recipiente, como una fuerza de impacto a la parte inferior del recipiente, o contacto directo con la cubierta con suficiente fuerza como para desviar la cubierta de forma interna.

25 En otro ejemplo de la técnica anterior en el actual campo técnico, es decir, en el documento WO 2011/034621 A2, se describe un método para lisar células, cuyo método incluye agitar células con un elemento agitador magnético en presencia de una pluralidad de perlas de lisis celular a una velocidad suficiente para lisar las células. Además, en el documento WO 2011/034621 A2, se describe un dispositivo para lisar células, cuyo dispositivo incluye un recipiente que tiene un elemento agitador magnético y una pluralidad de perlas de lisis celular dispuestas en él, en donde el recipiente está dimensionado para permitir la rotación del elemento de agitación magnético dentro del recipiente.

30 De forma convencional, un recipiente de muestra tiene una cámara interior circular con una superficie lisa. Aunque ideal para algunos usos, la superficie lisa puede impedir la mezcla o lisis eficiente. Por ejemplo, en vez de hacer numerosas colisiones productivas con los componentes celulares de la muestra líquida, las partículas rígidas usadas en la ruptura con perlas pueden viajar principalmente en un círculo en el diámetro interior del recipiente, generando pocas colisiones productivas. Por lo tanto, hay una necesidad no satisfecha en el campo para desarrollar métodos para aumentar la eficiencia con la que una mezcla líquida puede mezclarse y/o sus componentes celulares pueden lisarse.

**45 Compendio de la invención**

Solo como un ejemplo descriptivo, se describen los recipientes para operaciones de mezcla y lisis celular en un medio de laboratorio, tal como un recipiente (por ejemplo, un tubo) que incluye una cámara interior con un eje central, una parte superior que incluye una abertura, y una sección transversal esencialmente circular, en donde la superficie de la cámara interior incluye uno o más salientes esencialmente lineales esencialmente paralelos al eje central.

50 Como un ejemplo descriptivo adicional, se describe un recipiente (por ejemplo, un tubo), que incluye una cámara interior con un eje central, una parte superior que incluye una abertura, y una sección transversal esencialmente poligonal que tiene un radio, en donde el radio es la distancia del eje central a un punto en esquina. Aquí, la superficie de la cámara interior incluye uno o más salientes esencialmente lineales esencialmente paralelos al eje central. Además, la sección transversal esencialmente poligonal puede ser esencialmente triangular, cuadrada, pentagonal, hexagonal, heptagonal, octogonal, nonagonal, decagonal o dodecagonal.

Los recipientes anteriores pueden tener, por ejemplo, un volumen menor de 5 mL (por ejemplo, 4, 3, 2, 1,5, 1, 0,5 mL o menos). De forma ejemplar, el recipiente puede tener un volumen de 2,8 mL.

5 Los recipientes anteriores pueden tener uno o más salientes con una longitud paralela al eje central, una profundidad esencialmente paralela al radio de la sección transversal esencialmente circular o poligonal, y una anchura esencialmente perpendicular al radio. De forma ejemplar, la profundidad y/o anchura son constantes o varían a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. De forma alternativa, la profundidad y/o anchura aumenta desde la parte superior a la parte inferior del saliente esencialmente lineal. Además, la profundidad puede ser mayor del 10% del radio (por ejemplo, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% del radio) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. Además, la profundidad puede ser mayor del 20% del radio (por ejemplo, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 40%, 50%, 60% o 70% del radio) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. Además, la profundidad puede ser mayor del 30% del radio (por ejemplo, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% del radio) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. Se describe también que la profundidad de la parte superior y la parte inferior del saliente esencialmente lineal están al menos entre 0,3 y 0,5 milímetros (mm) (por ejemplo, al menos entre 0,3 a 0,35 mm, al menos entre 0,35 a 0,4 mm, al menos entre 0,4 a 0,45 mm, o al menos entre 0,45 a 0,5 mm) y 0,75 a 1 mm (por ejemplo, al menos entre 0,75 a 0,8 mm, al menos entre 0,8 a 0,85 mm, al menos entre 0,85 a 0,9 mm, al menos entre 0,9 a 0,95 mm, o al menos entre 0,95 a 1 mm), respectivamente. Las profundidades de la parte superior y la parte inferior del saliente esencialmente lineal pueden estar al menos entre 0,75 a 1,25 mm (por ejemplo, al menos entre 0,75 a 0,9 mm, al menos entre 0,9 a 1 mm, al menos entre 1 a 1,1 mm, o al menos entre 1,1 a 1,25 mm) y 1,75 a 2,25 mm (por ejemplo, al menos entre 1,75 a 1,9 mm, al menos entre 1,9 a 2 mm, al menos entre 2 a 2,1 mm, o al menos entre 2,1 a 2,25 mm), respectivamente.

15 Los recipientes ejemplarmente descritos anteriores pueden tener salientes con una longitud distal y una longitud proximal respecto al eje central, en donde las longitudes distal y proximal están cada una entre 40-95% de la altura del recipiente (por ejemplo, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% o 90-95% de la altura del recipiente). Aquí, la longitud proximal puede ser igual a o mayor que la longitud distal. Además, el uno o más salientes esencialmente lineales pueden ser esencialmente trapezoidales. Por ejemplo, las longitudes distales y proximales son cada una al menos alrededor de 15 mm. De forma alternativa, las longitudes distales y proximales pueden ser cada una alrededor de 30 mm.

25 Cualquiera de los recipientes anteriores puede tener salientes con una anchura mayor del 5% del radio (por ejemplo, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% o 25% del radio) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. De forma alternativa, la anchura puede ser mayor del 10% del radio (por ejemplo, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% o 30% del radio) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. Además, la anchura puede ser mayor del 15% del radio (por ejemplo, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% o 35% del radio) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. De forma ejemplar, la anchura puede estar al menos entre 0,025 a 0,175 mm (por ejemplo, al menos entre 0,025 a 0,075 mm, al menos entre 0,075 a 0,1 mm, al menos entre 0,1 a 0,15 mm, o al menos entre 0,15 a 0,175 mm) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. En otras realizaciones, la anchura está al menos entre 0,175 a 0,375 mm (por ejemplo, al menos entre 0,175 a 0,225 mm, al menos entre 0,225 a 0,275 mm, al menos entre 0,275 a 0,325 mm, o al menos entre 0,325 a 0,375 mm) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. De forma alternativa, la anchura puede estar al menos entre 0,5 a 0,7 mm (por ejemplo, al menos entre 0,5 a 0,55 mm, al menos entre 0,55 a 0,6 mm, al menos entre 0,6 a 0,65 mm, o al menos entre 0,65 a 0,7 mm) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal.

35 Los recipientes ejemplares descritos anteriormente pueden tener salientes que están angulados hacia la parte inferior del recipiente y alejados del radio de la sección transversal esencialmente circular o poligonal de entre aproximadamente 10° a 50°, por ejemplo, entre aproximadamente 10° a 25°, entre aproximadamente 25° a 35°, o entre aproximadamente 35° a 50°.

45 Las composiciones descritas anteriormente pueden tener una cámara interior que incluye 2 a 6 salientes esencialmente lineales (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 salientes esencialmente lineales). De forma alternativa, la cámara interior puede incluir 2 a 4 salientes esencialmente lineales. Además, los salientes esencialmente lineales pueden estar espaciados uniformemente en la cámara interior del recipiente.

50 Los recipientes ejemplares descritos anteriormente pueden además incluir una cubierta (por ejemplo, un tapón, tapa o superficie). Aquí, la cubierta puede incluir un paso que se extiende desde su superficie exterior a su superficie interior. Además, el paso puede incluir tres hendiduras espaciadas uniformemente (por ejemplo, una tri-hendidura) que convergen en un eje central de la cubierta. Además, la superficie exterior de la cubierta puede incluir una o más protuberancias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 protuberancias) entre cada una de las tres hendiduras espaciadas uniformemente. Además, la superficie interior puede incluir un anillo con peso que circunda las tres hendiduras espaciadas uniformemente. Las una o más protuberancias de la superficie exterior y el anillo con peso de la superficie interior pueden promover el cierre del paso (por ejemplo, cierre tras la apertura del paso mediante, por ejemplo, una punta de pipeta o una aguja). Además, se puede acceder a la cámara interior del recipiente a través del paso. Las cubiertas pueden, por ejemplo, evitar el escape de líquido del recipiente durante la agitación.

Cualquiera de los recipientes ejemplares descritos anteriormente puede construirse sin un material que no sea de poliestireno (por ejemplo, policarbonato).

5 También se describe un método ejemplar de mezcla de líquido en un recipiente, incluyendo el método agitar el líquido en cualquiera de los recipientes anteriores con, por ejemplo, un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice, por ejemplo, un mezclador de vórtice que agita en un movimiento por pulsos, por ejemplo, un mezclador de vórtice que agita de una manera circular modificada (por ejemplo, orbital planetaria)), mezclando así el líquido en el recipiente.

10 Se describe además un método ejemplar de mezcla de líquido en un recipiente, incluyendo el método (i) proporcionar líquido en cualquiera de los recipientes anteriores de la invención, donde el recipiente comprende partículas rígidas inertes (por ejemplo, perlas, esquirilas, barras de vidrio, y discos de vidrio), y (ii) agitar el líquido en el recipiente con, por ejemplo, un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice, por ejemplo, un mezclador de vórtice que agita en un movimiento por pulsos), mezclando así el líquido en el recipiente.

15 Actualmente, la presente invención presenta un método para lisar células en una muestra líquida, incluyendo el método proporcionar líquido en un recipiente que tiene un volumen de menos de 5 ml, el recipiente que comprende una cámara interior con un eje central, una parte superior que comprende una abertura, y una sección transversal esencialmente circular o esencialmente poligonal, en donde la superficie de dicha cámara interior comprende uno o más salientes esencialmente lineares esencialmente paralelos a dicho eje central, donde el líquido incluye partículas rígidas y células (por ejemplo, células de hongos o levaduras), y agitar el líquido en el recipiente con, por ejemplo, un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice, por ejemplo, un mezclador de vórtice que agita en un movimiento por pulsos, por ejemplo, un mezclador de vórtice que agita de una manera circular modificada (por ejemplo, orbital planetaria), en donde la agitación es de una fuerza y duración suficientes para lisar las células.

20 En aún otro aspecto, la invención presenta un método para detectar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una muestra de sangre completa, incluyendo el método: (i) proporcionar un extracto producido lisando los eritrocitos en una muestra de sangre completa de un sujeto (por ejemplo, un ser humano), centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y un granulado, descartar algo o todo el sobrenadante, y suspender de nuevo el granulado; (ii) lisar las células en el extracto, incluyendo el lisado combinar el extracto con partículas rígidas para formar una mezcla en un recipiente que tiene un volumen de menos de 5 ml, el recipiente que comprende una cámara interior con un eje central, una parte superior que comprende una abertura, y una sección transversal esencialmente circular o esencialmente poligonal, en donde la superficie de dicha cámara interior comprende uno o más salientes esencialmente lineares esencialmente paralelos a dicho eje central, y agitar la mezcla con, por ejemplo, un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice, por ejemplo, un mezclador de vórtice que agita en un movimiento por pulsos) para formar un lisato; (iii) proporcionar el lisato de la etapa (ii) en un tubo de detección y amplificar los ácidos nucleicos en él para formar una disolución de lisato amplificado que incluye del 40% (p/p) al 95% (p/p) del ácido nucleico objetivo (por ejemplo, de 40% a 60%, 60% a 80%, 80% a 90% o 90% a 95% (p/p) del ácido nucleico objetivo) y del 5% (p/p) al 60% (p/p) de ácido nucleico que no es objetivo (por ejemplo, de 5% a 20%, 20% a 35%, 35% a 40% o 40% a 60% (p/p) del ácido nucleico objetivo); y opcionalmente, (iv) detectar el ácido nucleico diana amplificado.

35 La invención también presenta un método de amplificación de un ácido nucleico objetivo en una muestra de sangre completa (i) proporcionando un extracto producido lisando los eritrocitos en una muestra de sangre completa de un sujeto (por ejemplo, un ser humano), centrifugando la muestra para formar un sobrenadante y un granulado, descartando algo o todo el sobrenadante, y suspendiendo de nuevo el granulado; (ii) lisando células en el extracto, el lisado que incluye combinar el extracto con partículas rígidas para formar una mezcla en el recipiente de la invención que tiene un volumen de menos de 5 ml, el recipiente que comprende una cámara interior con un eje central, una parte superior que comprende una abertura, y una sección transversal esencialmente circular o esencialmente poligonal, en donde la superficie de dicha cámara interior comprende uno o más salientes esencialmente lineares esencialmente paralelos a dicho eje central, y agitar la mezcla con, por ejemplo, un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice, por ejemplo, un mezclador de vórtice que agita en un movimiento por pulsos) para formar un lisato; (iii) proporcionando el lisato de la etapa (ii) en un tubo de detección y amplificando los ácidos nucleicos en él para formar una disolución de lisato amplificado que incluye de 40% (p/p) a 95% (p/p) del ácido nucleico objetivo (por ejemplo, de 40% a 60%, 60% a 80%, 80% a 90% o 90% a 95% (p/p) de ácido nucleico objetivo) y de 5% (p/p) a 60% (p/p) de ácido nucleico que no es objetivo (por ejemplo, de 5% a 20%, 20% a 35%, 35% a 40% o 40% a 60% (p/p) de ácido nucleico objetivo). En un aspecto relacionado, la invención presenta un método de preparación de una disolución de lisato amplificado por el método anterior.

50 El método anterior puede comprender además: (iv) después de la etapa (iii), proporcionar de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{13}$  partículas magnéticas por mililitro (por ejemplo, de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{11}$  o  $1 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{13}$  partículas magnéticas por mililitro) de la disolución de lisato amplificado, en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio de 700 nm a 1200 nm (por ejemplo, de 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o de 1000 a 1200 nm) y restos de unión en su superficie, los restos de unión operativos para alterar la agregación de las partículas magnéticas en presencia del ácido nucleico objetivo o un agente de unión multivalente; (v) colocar el tubo de detección en un dispositivo, el dispositivo que incluye un soporte que define un pocillo para contener el tubo de detección que incluye las partículas magnéticas y el ácido nucleico objetivo, y que tiene una bobina de RF dispuesta

5 alrededor del pocillo, la bobina de RF configurada para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más imanes y una secuencia de pulso de RF; (vi) exponer a la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulso de RF; (vii) después de la etapa (vi), medir la señal del tubo de detección; y (viii) en base al resultado de la etapa (vii), detectar el ácido nucleico objetivo, en donde la etapa (vii) se realiza, por ejemplo, sin ninguna purificación previa de la disolución de lisato amplificado.

10 En algunas realizaciones de los métodos de la invención que usan partículas inertes rígidas para mezclar o lisar, las partículas rígidas (por ejemplo, perlas, esquirlas, barras de vidrio y discos de vidrio) tienen un diámetro de entre aproximadamente 0,1 mm a 1 mm (por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 a 0,3 mm, entre aproximadamente 0,3 a 0,5 mm, entre aproximadamente 0,5 a 0,7 mm, entre aproximadamente 0,7 a 0,9 mm, o entre aproximadamente 0,9 a 1 mm). En otras realizaciones, las partículas rígidas tienen un diámetro de aproximadamente 0,8 mm.

En cualquiera de los métodos de la invención, el dispositivo de agitación es un mezclador de vórtice. En otra realización, el mezclador de vórtice agita en un movimiento lineal, planetario, de órbita vertical o por pulsos.

#### Definiciones

15 Los términos “agregación”, “aglomeración” y “agrupación” se usan de forma intercambiable en el contexto de las partículas magnéticas descritas en esta memoria y significan la unión de dos o más partículas magnéticas las unas con las otras, por ejemplo, por medio de un analito multivalente, forma multimérica del analito, anticuerpo, molécula de ácido nucleico, u otras molécula o entidad de unión. En algunos ejemplos, la aglomeración de partículas magnéticas es reversible.

20 Por “recipiente” se entiende un artículo de forma rígida con una parte superior, parte inferior y lados, en donde la parte superior contiene opcionalmente una abertura para el acceso a un interior que es capaz de contener muestras líquidas, gaseosas y/o sólidas. No está limitado a ninguna forma particular, y puede tener, por ejemplo, una sección transversal con una forma cuadrada, rectangular, triangular, circular u ovalada. En algunas realizaciones, el recipiente puede tener una superficie superior que se puede abrir, por ejemplo, una tapa, cubierta o tapón.

25 El término “partícula magnética” se refiere a partículas que incluyen materiales de alta susceptibilidad magnética positiva tal como compuestos paramagnéticos, compuestos superparamagnéticos y magnetita, óxido férrico gamma o hierro metálico.

30 Por “secuencia por pulsos” o “secuencia por pulsos de RF” se entiende uno o más pulsos de radiofrecuencia que se aplican a una muestra y se diseñan para medir, por ejemplo, ciertas velocidades de relajación de RMN, tal como las secuencias de eco de giro. Una secuencia por pulsos puede incluir también la adquisición de una señal después de uno o más pulsos para minimizar el ruido y mejorar la precisión en el valor de la señal resultante.

Como se usa en esta memoria, el término “señal” se refiere a una velocidad de relajación de RMN, desplazamiento de frecuencia, medida de susceptibilidad, medida de difusión o medidas de correlación.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

#### 35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una vista en perspectiva superior esquemática de un ejemplo de un recipiente, que muestra la posición relativa de cada saliente esencialmente lineal en la cámara interior del recipiente. Los tres salientes lineares están sombreados en gris para contrastar. El recipiente se representa como semi-transparente.

40 La figura 1B es una vista en perspectiva superior esquemática angulada del recipiente en la Figura 1A. Los tres salientes lineares están sombreados en gris para contrastar. El recipiente se representa como semi-transparente.

La Figura 2A es una vista en perspectiva superior esquemática ampliada de un ejemplo de un recipiente, que muestra la posición relativa de cada saliente esencialmente lineal en la cámara interior del recipiente.

La Figura 2B es una vista en perspectiva superior esquemática angulada ampliada del recipiente en la Figura 2A. El recipiente se representa como semi-transparente.

45 La Figura 2C es una vista en perspectiva inferior esquemática ampliada del recipiente en la Figura 2A.

La Figura 3A es una vista en perspectiva lateral esquemática angulada de un ejemplo de un recipiente. El recipiente se representa como semi-transparente.

La Figura 3B es una vista en perspectiva lateral en corte angulado del recipiente en la Figura 3A.

50 La Figura 4A es una vista en perspectiva lateral esquemática de un ejemplo de un recipiente. El recipiente no está representado como semi-transparente.

- La Figura 4B es una vista en perspectiva lateral esquemática del recipiente en la Figura 4A, rotada en 90° a lo largo del eje vertical.
- La Figura 5A es una vista en perspectiva lateral en corte de un ejemplo de un recipiente.
- La Figura 5B es una vista en perspectiva lateral en corte del recipiente en la Figura 5A, rotada sobre un eje vertical.
- 5 La Figura 6A es un dibujo que muestra las dimensiones de longitud, profundidad e inclinación relativas de un ejemplo de un saliente esencialmente lineal.
- La Figura 6B es un dibujo que representa las dimensiones de anchura de un ejemplo de un saliente esencialmente lineal, visto directamente a lo largo de la longitud del saliente.
- 10 La Figura 7A es una vista en perspectiva superior esquemática de un ejemplo de un recipiente con una sección transversal esencialmente cuadrada.
- La Figura 7B es una vista en perspectiva lateral esquemática del recipiente en la Figura 7A.
- La Figura 7C es una vista en perspectiva inferior esquemática del recipiente en la Figura 7A.
- La Figura 7D es una vista en perspectiva lateral esquemática angulada del recipiente en la Figura 7A.
- La Figura 7E es una vista en perspectiva lateral esquemática angulada del recipiente en la Figura 7A.
- 15 La Figura 8A es una vista en perspectiva superior en corte de un ejemplo de un recipiente con una sección transversal esencialmente cuadrada.
- La Figura 8B es una vista en perspectiva lateral en corte del recipiente en la Figura 8A, rotada en 90° a lo largo de un eje vertical.
- 20 La Figura 8C es una vista en perspectiva superior en corte del recipiente en la Figura 8A, rotada en 45° a lo largo de un eje horizontal.
- La Figura 8D es una vista en perspectiva lateral en corte del recipiente en la Figura 8C, rotada en 90° a lo largo de un eje vertical.
- La Figura 9A es una vista en perspectiva inferior esquemática de una mitad inferior de un recipiente con una sección transversal esencialmente cuadrada.
- 25 La Figura 9B es una vista en perspectiva lateral esquemática de la mitad inferior de un recipiente en la Figura 9A, rotada en 90° a lo largo de un eje vertical.
- Las Figuras 9C y 9D son vistas en perspectiva inferior esquemáticas de las mitades inferiores de recipientes con secciones transversales esencialmente circulares que tienen una o dos muescas, respectivamente.
- 30 Las Figuras 9E y 9F son vistas en perspectiva inferior esquemáticas de las mitades inferiores de recipientes con secciones transversales esencialmente triangulares que tienen lados rectos o curvados, respectivamente.
- La Figura 9G es una vista en perspectiva inferior esquemática de una mitad inferior de un recipiente con una sección transversal esencialmente cuadrada que tiene lados curvados.
- Las Figuras 9H-9J son vistas en perspectiva inferior esquemáticas de mitades inferiores de recipientes con lados esencialmente pentagonales, hexagonales y octogonales.
- 35 La Figura 10A es una vista en perspectiva lateral en corte de una cubierta para un recipiente, que representa el tamaño y la posición relativos de un anillo con peso en la superficie interior de la cubierta.
- La Figura 10B es una vista en perspectiva superior esquemática de una cubierta para un recipiente, que muestra la posición relativa de un paso de tri-hendidura y seis protuberancias.
- 40 La Figura 11 es un gráfico que muestra que la cantidad de lisis de células *Candida* en un ensayo de ruptura con perlas estándar es mayor de manera constante usando recipientes que incluyen tres salientes esencialmente lineares, o "aletas", en comparación con los recipientes estándar sin salientes lineares.
- 45 Mientras que la invención está abierta a diversas modificaciones y formas alternativas, los detalles de la misma se han mostrado por medio del ejemplo en los dibujos y se describirán en detalle. Debería entenderse, sin embargo, que la intención no es limitar la invención a las realizaciones particulares descritas. Por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que entran en el alcance de las reivindicaciones de la presente invención.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención está basada, al menos en parte, en recipientes para usar en mezclar o lisar células en una muestra líquida. Un recipiente puede tener una cámara interior con uno o más (por ejemplo, tres, cuatro o cinco) salientes esencialmente lineares, que promueven el proceso de mezcla o lisado. En algunas realizaciones, pueden añadirse partículas rígidas (por ejemplo, perlas) a la muestra líquida en el recipiente (o estar presentes en el recipiente antes de la adición de un líquido) para promover adicionalmente el proceso de mezcla o lisado. Un recipiente puede incluir además una cubierta con un paso (por ejemplo, una hendidura, por ejemplo, una tri-hendidura) que puede permitir el paso a la cámara interior del recipiente mientras sella de forma segura la abertura superior del recipiente.

**Recipientes para mezcla o lisado**

Las cámaras interiores de los recipientes pueden tener secciones transversales esencialmente circulares con salientes o secciones transversales esencialmente poligonales que tienen opcionalmente salientes. Ambos recipientes se adaptan particularmente para mezclar de forma eficiente una muestra líquida o lisar células en una muestra líquida.

**Recipientes con secciones transversales circulares**

Un recipiente puede incluir una cámara interior con un eje central, una parte superior con una abertura, y una sección transversal esencialmente circular, en donde la cámara interior incluye uno o más salientes esencialmente lineares (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 salientes esencialmente lineares) que son esencialmente paralelos al eje central. El recipiente puede usarse para aumentar la eficiencia de la mezcla de una muestra líquida o el lisado de células en una muestra líquida en comparación con un recipiente sin ningún saliente lineal. Por ejemplo, el uno o más salientes esencialmente lineares pueden promover colisiones productivas de las partículas rígidas usadas en la ruptura con perlas y evitar que viajen en un círculo durante el proceso de agitación, aumentando así la eficiencia de la lisis celular.

En algunas realizaciones, los recipientes con secciones transversales esencialmente circulares tienen uno o más salientes esencialmente lineares con una longitud paralela al eje central, una profundidad esencialmente paralela al radio de la sección transversal esencialmente circular, y una anchura esencialmente perpendicular al radio. La profundidad y/o anchura puede variar a lo largo de la longitud del saliente lineal. En algunas realizaciones, la profundidad y/o anchura aumenta de la parte superior a la parte inferior del saliente lineal. La profundidad del saliente esencialmente lineal puede ser, por ejemplo, mayor del 10% del radio (por ejemplo, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% del radio), mayor del 20% del radio (por ejemplo, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 40%, 50%, 60% o 70% del radio), o mayor del 30% del radio (por ejemplo, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% del radio) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. En otras realizaciones, las profundidades de la parte superior y la parte inferior de los salientes esencialmente lineares están al menos entre 0,3 a 0,5 milímetros (mm) (por ejemplo, al menos entre 0,3 a 0,35 mm, al menos entre 0,35 a 0,4 mm, al menos entre 0,4 a 0,45 mm, o al menos entre 0,45 a 0,5 mm) y 0,75 a 1 mm (por ejemplo, al menos entre 0,75 a 0,8 mm, al menos entre 0,8 a 0,85 mm, al menos entre 0,85 a 0,9 mm, al menos entre 0,9 a 0,95 mm, o al menos entre 0,95 a 1 mm), respectivamente; o al menos entre 0,75 a 1,25 mm (por ejemplo, al menos entre 0,75 a 0,9 mm, al menos entre 0,9 a 1 mm, al menos entre 1 a 1,1 mm, o al menos entre 1,1 a 1,25 mm) y 1,75 a 2,25 mm (por ejemplo, al menos entre 1,75 a 1,9 mm, al menos entre 1,9 a 2 mm, al menos entre 2 a 2,1 mm, o al menos entre 2,1 a 2,25 mm), respectivamente. Ejemplos de recipientes con una sección transversal circular y tres salientes esencialmente lineares, cada uno con profundidad y anchura que aumentan desde la parte superior a la parte inferior del saliente, se representan en detalle en las Figuras 1A-5B. Las Figuras 9C y 9D representan ejemplos de recipientes con secciones transversales esencialmente circulares. Como se representa en la Figura 6A, un saliente esencialmente lineal puede tener, por ejemplo, una profundidad en la parte superior y la parte inferior de alrededor de 1 y 1,92 mm, respectivamente, que corresponde a alrededor del 18% y 35% del radio del recipiente para un recipiente con un radio de 5,5 mm.

Los recipientes con secciones transversales esencialmente circulares pueden tener uno o más salientes esencialmente lineares que pueden variar en la longitud. En algunas realizaciones, los recipientes con secciones transversales esencialmente circulares tienen uno o más salientes esencialmente lineares con una longitud distal y una longitud proximal respecto al eje central, en donde las longitudes distal y proximal están cada una entre 40-95% de la altura del recipiente (por ejemplo, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% o 90-95% de la altura del recipiente). En algunas realizaciones, la longitud proximal puede ser mayor que la longitud distal. El uno o más salientes esencialmente lineares pueden ser por consiguiente trapezoidales, por lo que los bordes que controlan la profundidad del saliente son paralelos, pero las longitudes no. En algunas realizaciones, las longitudes distal y proximal son cada una al menos 15 mm. En otras realizaciones, las longitudes distal y proximal son cada una al menos 30 mm. Como se representa en las Figuras 1B, 3A, 3B, 5A y 5B, los salientes esencialmente lineares pueden tener, por ejemplo, longitudes que abarcan casi la altura total del recipiente, desde cerca de la abertura superior a cerca del fondo del recipiente.

En algunas realizaciones, el uno o más salientes esencialmente lineares pueden tener salientes con una anchura mayor del 5% del radio (por ejemplo, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% o 25% del radio), mayor del 10% del radio (por ejemplo, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% o 30% del radio), o mayor del 15% del radio (por ejemplo, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% o 35% del radio) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. En otras realizaciones, la

anchura está al menos entre 0,025 a 0,175 mm (por ejemplo, al menos entre 0,025 a 0,075 mm, al menos entre 0,075 a 0,1 mm, al menos entre 0,1 a 0,15 mm, o al menos entre 0,15 a 0,175 mm), al menos entre 0,175 a 0,375 mm (por ejemplo, al menos entre 0,175 a 0,225 mm, al menos entre 0,225 a 0,275 mm, al menos entre 0,275 a 0,325 mm, o al menos entre 0,325 a 0,375 mm), o al menos entre 0,5 a 0,7 mm (por ejemplo, al menos entre 0,5 a 0,55 mm, al menos entre 0,55 a 0,6 mm, al menos entre 0,6 a 0,65 mm, o al menos entre 0,65 a 0,7 mm) en algún punto a lo largo de la longitud del saliente esencialmente lineal. Como se representa en la Figura 6B, un saliente esencialmente lineal puede tener, por ejemplo, una anchura que aumenta a lo largo de la longitud del saliente a una anchura máxima de 0,635 mm, o alrededor de 11,5% del radio del recipiente para un recipiente con un radio de 5,5 mm.

En algunas realizaciones, por ejemplo, como se representa en las Figuras 1B, 3A, 3B, 5A y 5B, los salientes esencialmente lineales de los recipientes representados están angulados hacia la parte inferior del recipiente y alejados del radio de la sección transversal esencialmente circular por entre aproximadamente 10° a 50° (por ejemplo, entre aproximadamente 10° a 25°, entre aproximadamente 25° a 35°, o entre aproximadamente 35° a 50°). Como se representa en la Figura 6A, un saliente esencialmente lineal puede estar angulado, por ejemplo hacia abajo en 30°, lo que se refleja en un ángulo de 60° formado por la profundidad de la parte superior y la longitud distal del saliente lineal en vez de un ángulo de 90°, en el caso en que el saliente no esté angulado.

Los recipientes con secciones transversales esencialmente circulares pueden tener una cámara interior que incluye 2 a 6 salientes esencialmente lineales (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 salientes esencialmente lineales). En algunas realizaciones, la cámara interior incluye 2 a 4 salientes esencialmente lineales. Los salientes pueden, en algunos casos, estar espaciados uniformemente en la cámara interior del recipiente. Un ejemplo de un recipiente con una sección transversal esencialmente circular y tres salientes esencialmente lineales espaciados uniformemente se representa en las Figuras 1A y 1B.

Los recipientes pueden incluir adicionalmente una cubierta (por ejemplo, un tapón, tapa o superficie). La cubierta puede estar completamente cerrada o incluir un paso que se extiende de su superficie exterior a su superficie interior. El paso puede incluir, por ejemplo, tres hendiduras espaciadas uniformemente (por ejemplo, una tri-hendidura) que converge en un eje central de la cubierta. La tri-hendidura puede incluir, por ejemplo, cortes radiales cortos, que paran antes de que alcancen el borde de la cubierta. En comparación con una única hendidura de lado a lado, la tri-hendidura puede, por ejemplo, extenderse menos y abrirse menos mediante una fuerza que actúa para abrir el paso (por ejemplo, la inserción de una punta de pipeta). En algunas realizaciones, la cubierta incluye adicionalmente una o más protuberancias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 protuberancias), o bultos, entre los alrededores o el entorno de la hendidura o hendiduras (por ejemplo, tres hendiduras espaciadas uniformemente). En otras realizaciones, la superficie interior puede incluir un anillo con peso que rodea la hendidura o hendiduras. Las una o más protuberancias de la superficie exterior y el anillo con peso de la superficie interior promueven el cierre del paso (por ejemplo, cierre tras la apertura del paso para acceder a la cámara interior mediante, por ejemplo, una punta de pipeta o una aguja). Las Figuras 10A y 10B representan un ejemplo de una cubierta para un recipiente. En este ejemplo, la cubierta es circular e incluye un paso de tri-hendidura, dos protuberancias entre cada hendidura (seis en total), y un anillo con peso para reducir la extensión de la superficie interior de la cubierta.

#### Recipientes con secciones transversales poligonales

Como se representa en las Figuras 7A-9B y 9E-9J, los recipientes pueden incluir de forma alternativa una cámara interior con un eje central, una parte superior con una abertura, y una sección transversal esencialmente poligonal, en donde el radio de la sección transversal es la distancia desde el eje central a un punto en esquina. Los recipientes pueden tener, por ejemplo, esquinas esencialmente angulares en la cámara interior que soportan la mezcla eficiente de una muestra líquida y/o lisis celular en una muestra líquida. Por ejemplo, en un procedimiento de lisis por ruptura con perlas, las esquinas angulares pueden evitar que las partículas rígidas (por ejemplo, perlas) circulen de forma improductiva alrededor del diámetro del tubo por la fuerza de la unidad de agitación (por ejemplo, el mezclador de vórtice).

Los recipientes con secciones transversales poligonales pueden incluir opcionalmente los salientes esencialmente lineales en los lados del polígono, como se describe anteriormente para los recipientes con secciones transversales esencialmente circulares. Las secciones transversales esencialmente poligonales pueden ser, por ejemplo, esencialmente triangulares, cuadradas, pentagonales, hexagonales, heptagonales, octogonales, nonagonales, decagonales o dodecagonales. En algunos ejemplos, los lados de la sección transversal poligonal pueden estar curvados (véanse, por ejemplo, las Figuras 9F y 9G). Aunque la cámara interior incluye una región con una sección transversal esencialmente poligonal, todo o una parte del exterior del tubo puede ser esencialmente circular (por ejemplo, para usar con soportes de tubo cilíndricos y/o cónicos tradicionales en, por ejemplo, una unidad centrífuga). Como se representa en las Figuras 7A-8D, los recipientes con secciones transversales poligonales pueden conservar, por ejemplo, una mitad superior con una abertura circular. Esta característica permite a todos los recipientes tener potencialmente aberturas circulares uniformes, permitiendo así que los recipientes se manejen fácilmente por un brazo robótico automatizado (por ejemplo, una pinza de agarre). Como se describe anteriormente para los recipientes con secciones transversales circulares, los recipientes con secciones transversales poligonales pueden incluir adicionalmente una cubierta, que sella de forma segura la abertura superior del recipiente. En las realizaciones en que



la parte superior del recipiente es poligonal, la cubierta tendrá típicamente la misma forma de sección transversal general.

Métodos para mezclar o lisar

5 La presente invención incluye métodos para mezclar una muestra líquida o lisar células (por ejemplo, células de hongo) en una muestra líquida que usan los recipientes de la invención. En un aspecto, una muestra líquida puede mezclarse agitando el líquido en un recipiente (por ejemplo, un recipiente con una sección transversal esencialmente circular o poligonal, como se describe anteriormente) usando un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice), mezclando así la mezcla líquida. En otro aspecto, una muestra líquida puede mezclarse (i) proporcionando líquido en un recipiente (por ejemplo, un recipiente con una sección transversal esencialmente circular o poligonal, como se describe anteriormente), donde el líquido comprende partículas rígidas (por ejemplo, perlas), y (ii) agitando el líquido en el recipiente con un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice), mezclando así la muestra líquida. Los salientes esencialmente lineales y/o esquinas esencialmente angulares en las cámaras interiores de los recipientes soportan la mezcla eficiente de una muestra líquida.

15 En otros aspectos, las células en una muestra líquida pueden lisarse proporcionando la muestra líquida en un recipiente (por ejemplo, un recipiente con una sección transversal esencialmente circular o poligonal, como se describe anteriormente), donde el líquido incluye partículas rígidas (por ejemplo, perlas) y células (por ejemplo, células de hongo), y agitando el líquido en el recipiente con un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice), en donde la agitación es de una fuerza y duración suficientes para lisar las células.

20 En cualquiera de los métodos para mezclar o lisar células, las partículas rígidas (por ejemplo, perlas) pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 0,2 mm a 1 mm (por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 a 0,3 mm, entre aproximadamente 0,3 a 0,5 mm, entre aproximadamente 0,5 a 0,7 mm, entre aproximadamente 0,7 a 0,9 mm, o entre aproximadamente 0,9 a 1 mm). En algunas realizaciones, las partículas rígidas tienen un diámetro de 0,8 mm. Las partículas rígidas pueden ser, por ejemplo, perlas de vidrio de 0,5 mm, perlas de sílice de 0,1 mm, perlas de sílice de 0,7 mm, o una mezcla de perlas de diferentes tamaños (por ejemplo, perlas, esquirlas, barras de vidrio y discos de vidrio). El dispositivo de agitación (por ejemplo, mezclador de vórtice) usado para facilitar la mezcla o lisado de células puede agitar, por ejemplo, en un movimiento lineal, planetario, de órbita vertical o por pulsos.

Métodos para detectar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una muestra de sangre completa

30 La detección de un analito biológico (por ejemplo, un ácido nucleico) en una muestra puede necesitar que el analito se extraiga primero de un organismo biológico en la muestra. Para organismos biológicos con paredes celulares particularmente filamentosas (por ejemplo, levadura, bacterias y algas), un método fuerte de ruptura celular (por ejemplo, ruptura con perlas) debe emplearse para extraer un analito objetivo intracelular. En algunos ejemplos, el analito biológico puede estar presente a una baja concentración en la muestra debido a que la muestra tiene una baja concentración del organismo biológico. Por ejemplo, si un sujeto se infectó recientemente con un organismo biológico, tal como el hongo *Candida albicans*, la concentración del microorganismo en una muestra de sangre del sujeto puede ser baja. Por consiguiente, la capacidad para lisar de forma eficiente el organismo biológico y detectar el analito objetivo con alta sensibilidad es importante de forma crítica.

40 La presente invención presenta un método para detectar la presencia de un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, un ácido nucleico objetivo de un hongo, por ejemplo, un hongo del género *Candida*) en una muestra de sangre completa, incluyendo el método: (i) proporcionar un extracto producido lisando los eritrocitos en una muestra de sangre completa de un sujeto (por ejemplo, un ser humano), centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y un granulado, descartar algo o todo el sobrenadante, y suspender de nuevo el granulado (por ejemplo, el granulado que contiene las células de hongo); (ii) lisar las células en el extracto, incluyendo el lisado combinar el extracto con partículas rígidas (por ejemplo, perlas o esquirlas como se describe anteriormente) para formar una mezcla en un recipiente (por ejemplo, un recipiente con una sección transversal esencialmente circular o poligonal, como se describe anteriormente), y agitar la mezcla con un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice) para formar un lisato; (iii) proporcionar el lisato de la etapa (ii) en un tubo de detección y amplificar los ácidos nucleicos en él para formar una disolución de lisato amplificado que incluye del 40% (p/p) al 95% (p/p) del ácido nucleico objetivo (por ejemplo, de 40% a 60%, 60% a 80%, 80% a 90% o 90% a 95% (p/p) del ácido nucleico objetivo) y del 5% (p/p) al 60% (p/p) de ácido nucleico no objetivo (por ejemplo, de 5% a 20%, 20% a 35%, 35% a 40% o 40% a 60% (p/p) de ácido nucleico objetivo); y (iv) detectar el ácido nucleico objetivo amplificado.

55 La invención también presenta un método para detectar la presencia de un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, un ácido nucleico objetivo de un hongo, por ejemplo, un hongo de género *Candida*) en una muestra de sangre completa, incluyendo el método: (i) proporcionar un extracto producido lisando los eritrocitos en una muestra de sangre completa de un sujeto (por ejemplo, un ser humano), centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y un granulado, descartar algo o todo el sobrenadante, y suspender de nuevo el granulado (por ejemplo, el granulado que contiene las células de hongo) para formar un extracto; (ii) lisar células en el extracto, incluyendo el lisado combinar el extracto con partículas rígidas (por ejemplo, las perlas, como se describe anteriormente) para formar una mezcla en un recipiente (por ejemplo, un recipiente con sección transversal esencialmente circular o poligonal, como se describe anteriormente), y agitar la mezcla con un dispositivo de agitación (por ejemplo, un mezclador de vórtice) para formar

un lisato; (iii) colocar el lisato de la etapa (ii) en un tubo de detección y amplificar los ácidos nucleicos en él para formar una disolución de lisato amplificado que comprende de 40% (p/p) a 95% (p/p) del ácido nucleico objetivo (por ejemplo, de 40% a 60%, 60% a 80%, 80% a 90% o 90% a 95% (p/p) de ácido nucleico objetivo) y de 5% (p/p) a 60% (p/p) de ácido nucleico no objetivo (por ejemplo, de 5% a 20%, 20% a 35%, 35% a 40% o 40% a 60% (p/p) de ácido nucleico objetivo); (iv) después de la etapa (iii), proporcionar de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{13}$  partículas magnéticas por mililitro (por ejemplo, de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{11}$  o  $1 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{13}$  partículas magnéticas por mililitro) de la disolución de lisato amplificado, en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio de 700 nm a 1200 nm (por ejemplo, de 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o de 1000 a 1200 nm) y restos de unión en su superficie, los restos de unión operativos para alterar la agregación de las partículas magnéticas en presencia del ácido nucleico objetivo o un agente de unión multivalente; (v) colocar el tubo de detección en un dispositivo, el dispositivo que incluye un soporte que define un pocillo para contener el tubo de detección que incluye las partículas magnéticas y el ácido nucleico objetivo, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pocillo, la bobina de RF configurada para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más imanes y una secuencia de pulsos de RF; (vi) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF; (vii) después de la etapa (vi), medir la señal del tubo de detección; y (viii) en base al resultado de la etapa (vii), detectar el ácido nucleico objetivo, en donde la etapa (vii) se realiza sin ninguna purificación previa de la disolución de lisato amplificado. Se describen métodos y reactivos adicionales (por ejemplo, sondas específicas para *Candida*) en la Solicitud de patente de EE.UU. núm. 13/363.916.

#### Detección de una infección por hongos en un sujeto

Las composiciones descritas en esta memoria permiten métodos de monitorización y diagnóstico de la enfermedad infecciosa en un sistema multiplexado, automatizado, sin preparación de muestra. Dichos sistemas y métodos podrían usarse para monitorizar, por ejemplo, la infección por hongos, tal como candidemia. La diagnosis temprana de la candidemia es clínicamente importante ya que este tipo de infección, si de deja sin tratar, puede llevar a una variedad de diferentes síntomas (dependiendo del área del cuerpo afectada) que incluyen, aunque no están limitados a, lesiones y úlceras de la boca, encías sangrantes, quemazón al orinar, irritación vaginal, picor vaginal, diarrea, náuseas y vómitos. Las infecciones de *Candida* son patógenos cada vez más importantes en la UCIN. Los factores de riesgo para el desarrollo de candidemia en neonatos incluyen edad gestacional menor de 32 semanas, valores de Apgar a 5 min de menos de 5, shock, coagulopatía intravascular diseminada, uso previo de intralípidos, administración de nutrición parenteral, uso de CVC, administración de bloqueante H<sub>2</sub>, intubado, o duración de la estancia mayor de 7 días.

En general, una muestra de sangre completa puede tomarse de un sujeto sospechoso de candidemia, y la presencia de, por ejemplo, una región genómica *Candida* conservada que es objetivo puede detectarse mediante el uso de los métodos de la invención descritos en detalle anteriormente.

#### Ejemplo

El siguiente ejemplo se proporciona con el propósito de ilustrar la invención y no pretende limitar la invención de ninguna forma.

##### Ejemplo 1. Lisis celular aumentada usando recipientes con salientes esencialmente lineares

La eficiencia de la lisis celular de hongos usando recipientes de 2,8 ml que incluyen tres salientes esencialmente lineares espaciados uniformemente ("aletas") se comparó con la eficiencia alcanzada con recipientes de 2,8 ml estándar. Ocho aislados de células fúngicas (a una concentración de 3 células/mL) se ensayaron por duplicado en los dos tipos de recipientes. A cada uno de los recipientes, se añadieron perlas de zirconia de 0,7 mm y los recipientes se agitaron con un mezclador de vórtice a 2800 rpm (+/- 400 rpm) durante 8 minutos para los recipientes que incluían los tres salientes o 2000 rpm (+/- 400 rpm) durante 5 minutos para los recipientes de 2,8 ml estándar. Después del procedimiento de ruptura con perlas, una alícuota de cada lisato se sometió entonces a amplificación por PCR mediante la adición del lisato a una mezcla maestra para PCR que incluía nucleótidos; tampón ((NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM, glicerol al 6%, Tricina 60 mM, pH = 8,7); cebadores específicos para *Candida* (cebador directo en exceso de 4x para permitir la producción de hebra sencilla asimétrica en el producto final); y polimerasa termoestable (HemoKlenTaq (New England Biolabs)). Las partículas magnéticas se conjugaron con los ácidos nucleicos, cada una con secuencia complementaria a una parte del objetivo amplificado de manera que las partículas magnéticas agregadas en presencia del ácido nucleico objetivo, se añadieron a la reacción de amplificación por PCR. El ácido nucleico de *Candida* objetivo amplificado se detectó entonces midiendo los tiempos de relajación T<sub>2</sub> (mseg.). Si todas las demás variables en el ensayo de detección tienen contribuciones aproximadamente iguales, entonces la diferencia en la detección del ácido nucleico objetivo puede correlacionarse directamente con la eficiencia de la lisis celular.

Como se representa en la Figura 11, los datos indican que la detección aumentada del ácido nucleico objetivo se observa para células *Candida* lisadas en recipientes que tienen tres salientes en comparación con la obtenida a partir de recipientes estándar sin salientes. Los datos mostraron que los tiempos de relajación T<sub>2</sub> que miden los niveles de ácido nucleico objetivo del primer grupo fueron uniformemente mayores que las medidas de T<sub>2</sub> obtenidas del último grupo. Ambos grupos mostraron señales T<sub>2</sub> significativamente mayores que las obtenidas de los cuatro experimentos

de control en cada grupo. En suma, los datos indican que los recipientes aumentan la eficiencia de la lisis celular (por ejemplo, en un ensayo de ruptura con perlas) respecto a los recipientes estándar conocidos en la técnica.

**Otras realizaciones**

- 5 Diversas modificaciones y variaciones del método descrito de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin separarse del alcance de las reivindicaciones de la presente invención. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas, debería entenderse que la invención como se reivindica no estaría excesivamente limitada a dichas realizaciones específicas. Otras realizaciones están en las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para lisar células en una muestra líquida, comprendiendo dicho método proporcionar líquido en un recipiente que tiene un volumen de menos de 5 ml, el recipiente que comprende una cámara interior con un eje central, una parte superior que comprende una abertura, y una sección transversal esencialmente circular o esencialmente poligonal, en donde la superficie de dicha cámara interior comprende uno o más salientes esencialmente lineares esencialmente paralelos a dicho eje central, en donde dicho líquido comprende partículas rígidas y células; y
- Agitar dicho líquido en dicho recipiente, en donde dicha agitación es de una fuerza y duración suficientes como para lisar dichas células.
- 10 2. Un método para detectar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una muestra de sangre completa, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar un extracto producido lisando eritrocitos en una muestra de sangre completa de un sujeto, centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y un granulado, descartar algo o todo el sobrenadante, y suspender de nuevo el granulado;
- 15 (b) lisar células en dicho extracto, comprendiendo dicho lisado combinar el extracto con partículas rígidas para formar una mezcla en un recipiente que tiene un volumen de menos de 5 ml, el recipiente que comprende una cámara interior con un eje central, una parte superior que comprende una abertura, y una sección transversal esencialmente circular o esencialmente poligonal, en donde la superficie de dicha cámara interior comprende uno o más salientes esencialmente lineares esencialmente paralelos a dicho eje central, y agitar la mezcla para formar un lisato;
- 20 (c) proporcionar el lisato de la etapa (b) en un tubo de detección y amplificar los ácidos nucleicos en él para formar una disolución de lisato amplificado que comprende de 40% (p/p) a 95% (p/p) del ácido nucleico objetivo y de 5% (p/p) a 60% (p/p) de ácido nucleico no objetivo; y
- (d) detectar el ácido nucleico objetivo amplificado.
- 25 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dichas partículas rígidas tienen un diámetro de entre 0,1 mm a 1 mm, preferiblemente 0,8 mm.
4. Un método para amplificar un ácido nucleico objetivo en una muestra de sangre completa, comprendiendo el método:
- 30 (a) proporcionar un extracto producido lisando eritrocitos en una muestra de sangre completa de un sujeto, centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y un granulado, descartar algo o todo el sobrenadante, y suspender de nuevo el granulado;
- 35 (b) lisar células en dicho extracto, comprendiendo dicho lisado combinar el extracto con partículas rígidas para formar una mezcla en un recipiente que tiene un volumen de menos de 5 ml, el recipiente que comprende una cámara interior con un eje central, una parte superior que comprende una abertura, y una sección transversal esencialmente circular o esencialmente poligonal, en donde la superficie de dicha cámara interior comprende uno o más salientes esencialmente lineares esencialmente paralelos a dicho eje central, y agitar la mezcla para formar un lisato; y
- (c) proporcionar el lisato de la etapa (b) en un tubo de detección y amplificar los ácidos nucleicos en él para formar un lisato amplificado que comprende del 40% (p/p) al 95% (p/p) del ácido nucleico objetivo y del 5% (p/p) al 60% (p/p) del ácido nucleico no objetivo.
- 40 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el recipiente tiene una sección transversal esencialmente circular.
6. El método según la reivindicación 5, en donde los salientes esencialmente lineares están espaciados uniformemente en la cámara interior del recipiente.
- 45 7. El método según la reivindicación 5, en donde el recipiente tiene un radio y un eje central, en donde dichos salientes esencialmente lineares tienen una longitud paralela a dicho eje central, una profundidad esencialmente paralela al radio, y una anchura esencialmente perpendicular a dicho radio, y en donde la profundidad y/o anchura aumenta de la parte superior a la parte inferior de dichos salientes esencialmente lineares.
8. El método según la reivindicación 7, en donde la profundidad de dichos salientes esencialmente lineares es mayor del 10% del radio en algún punto a lo largo de la longitud de dichos salientes esencialmente lineares.
- 50 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el recipiente tiene una sección transversal esencialmente poligonal.

10. El método según la reivindicación 9, en donde dicha sección transversal esencialmente poligonal es esencialmente triangular, cuadrada, pentagonal, hexagonal, heptagonal, octogonal, nonagonal, decagonal o dodecagonal.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el recipiente tiene (x) una sección transversal esencialmente circular que tiene un radio o (y) una sección transversal esencialmente poligonal que tiene un radio, en donde dicho radio es la distancia de dicho eje central a un punto en esquina, y dicho uno o más salientes esencialmente lineares tienen una longitud paralela a dicho eje central, una profundidad esencialmente paralela al radio de dicha sección transversal esencialmente circular o poligonal, y una anchura esencialmente perpendicular a dicho radio.
12. El método según la reivindicación 11, en donde dicha profundidad y/o anchura aumenta desde la parte superior a la parte inferior de dicho saliente esencialmente lineal.
- 10 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha cámara interior comprende 2 a 6 salientes esencialmente lineares.

Figura 1

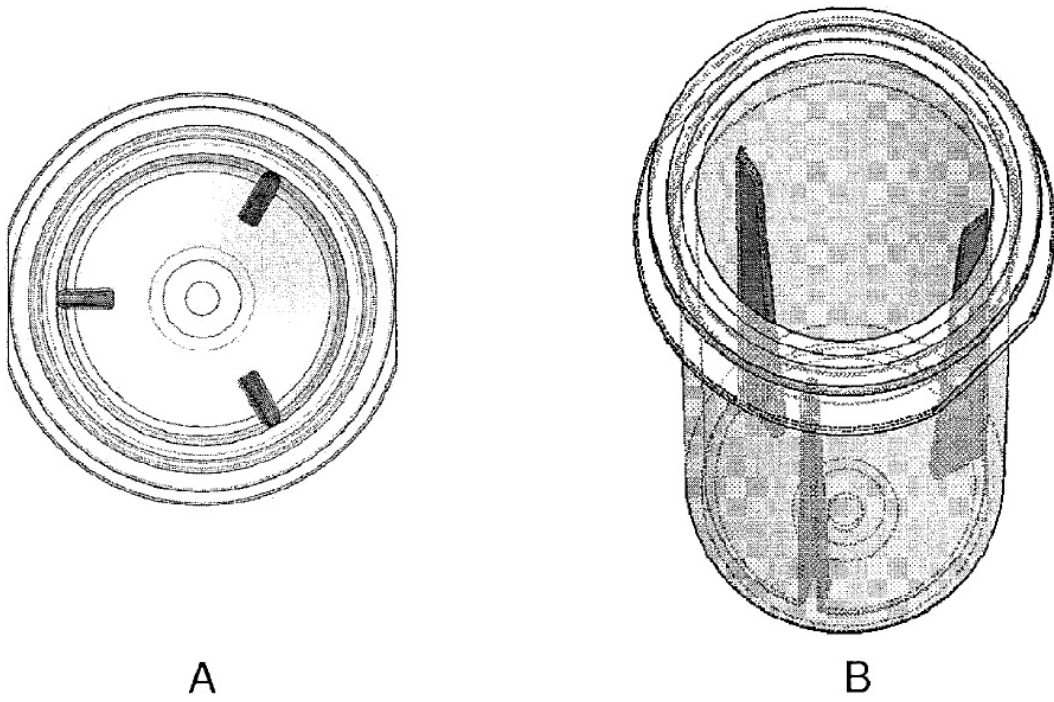


Figura 2A

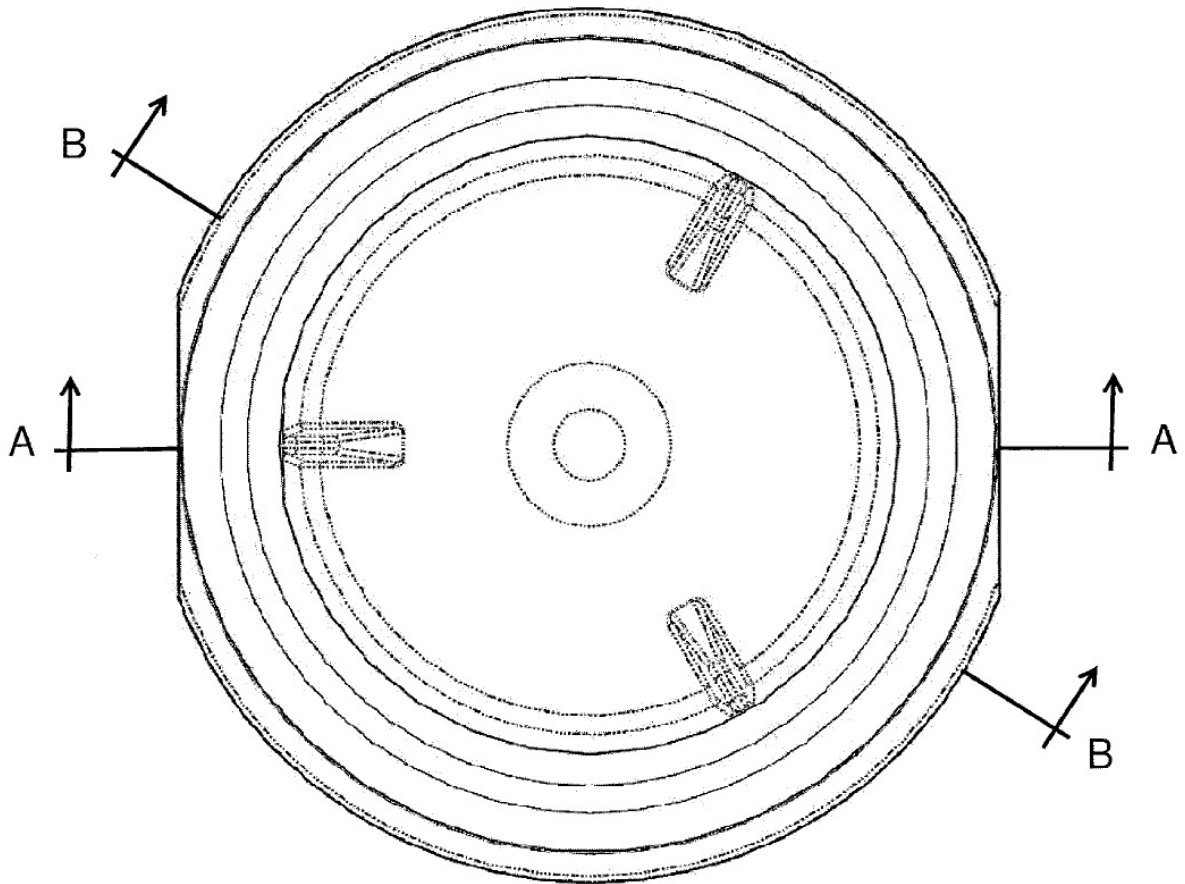


Figura 2B

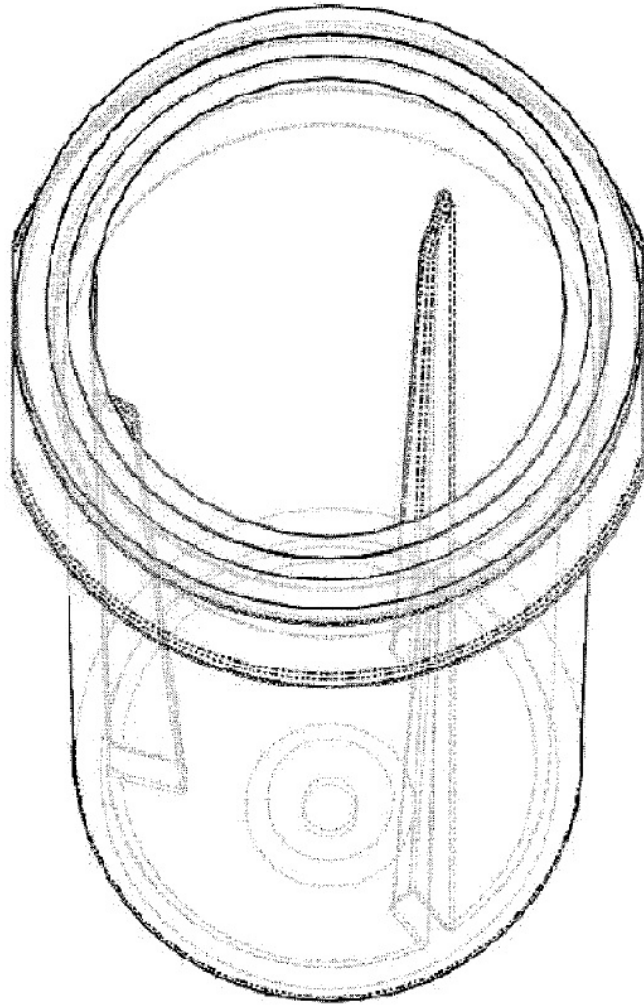




Figura 2C

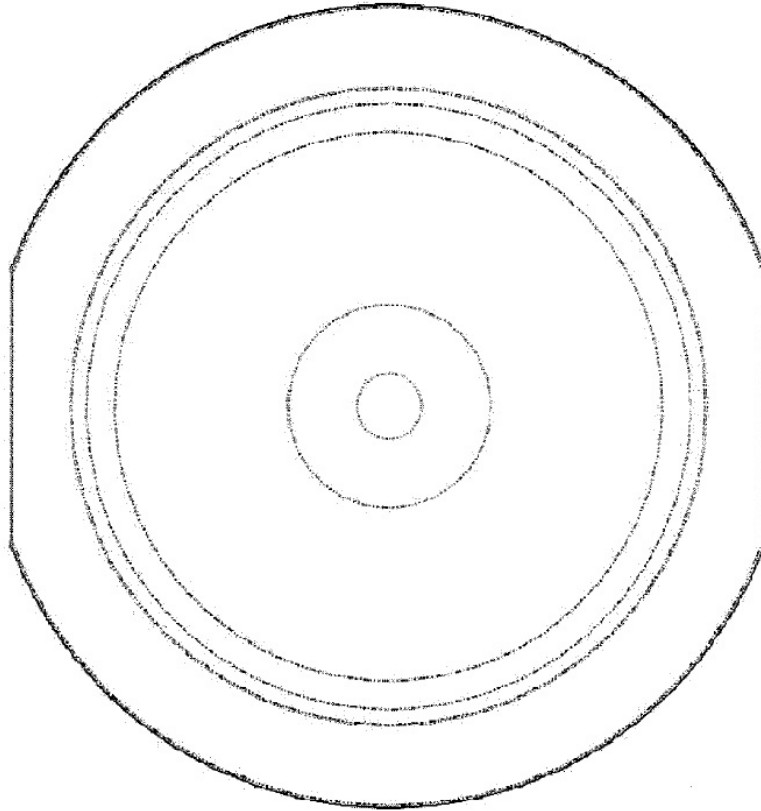


Figura 3A

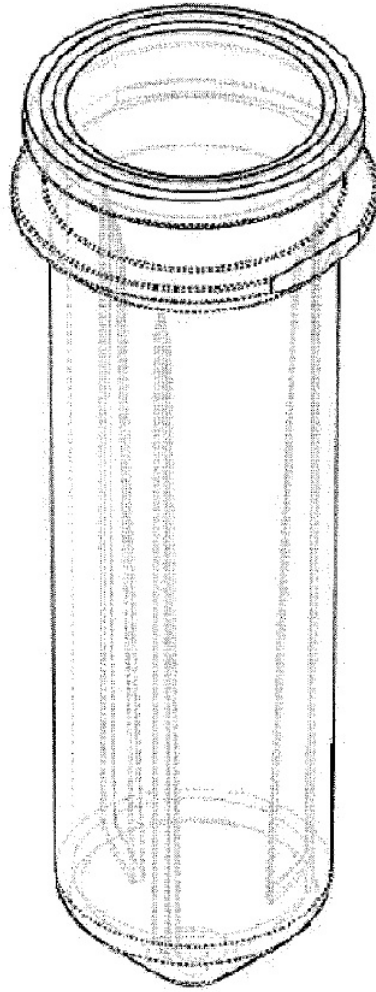


Figura 3B

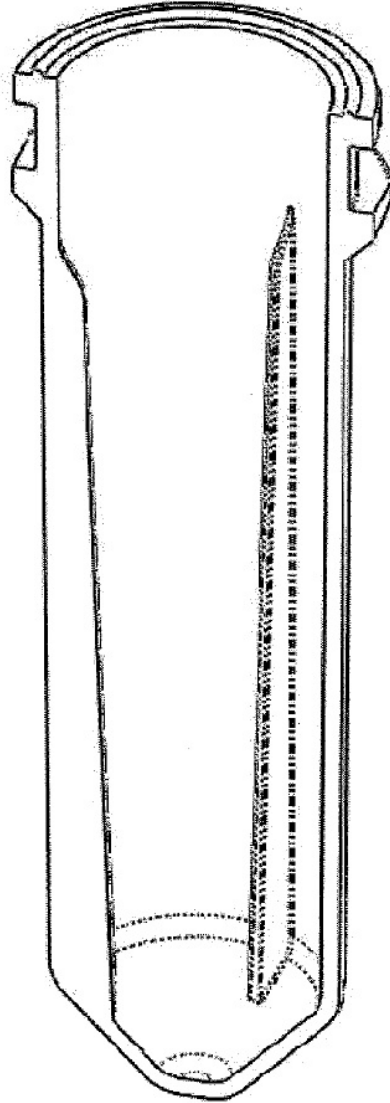


Figura 4A

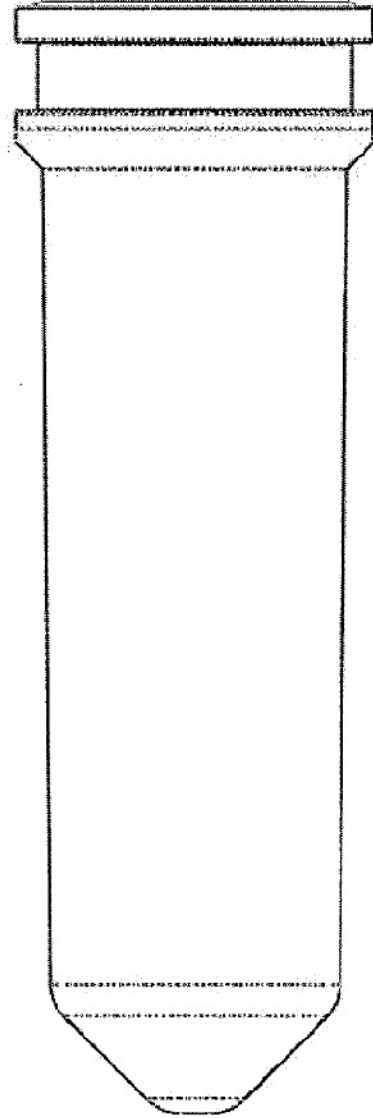


Figura 4B

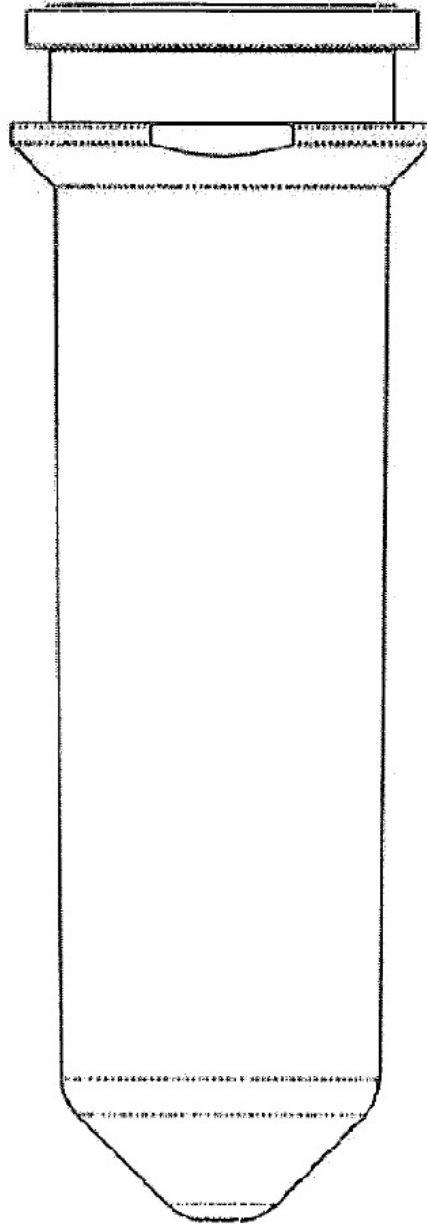


Figura 5A

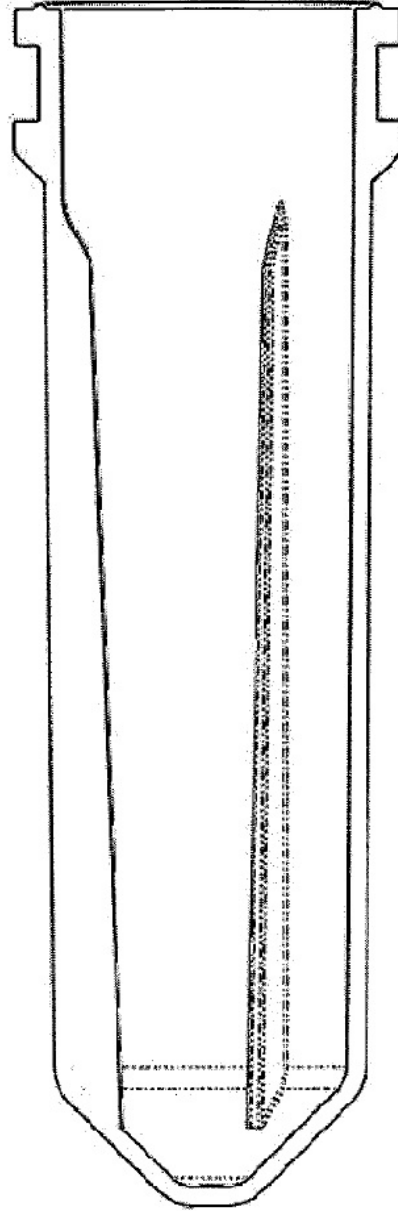
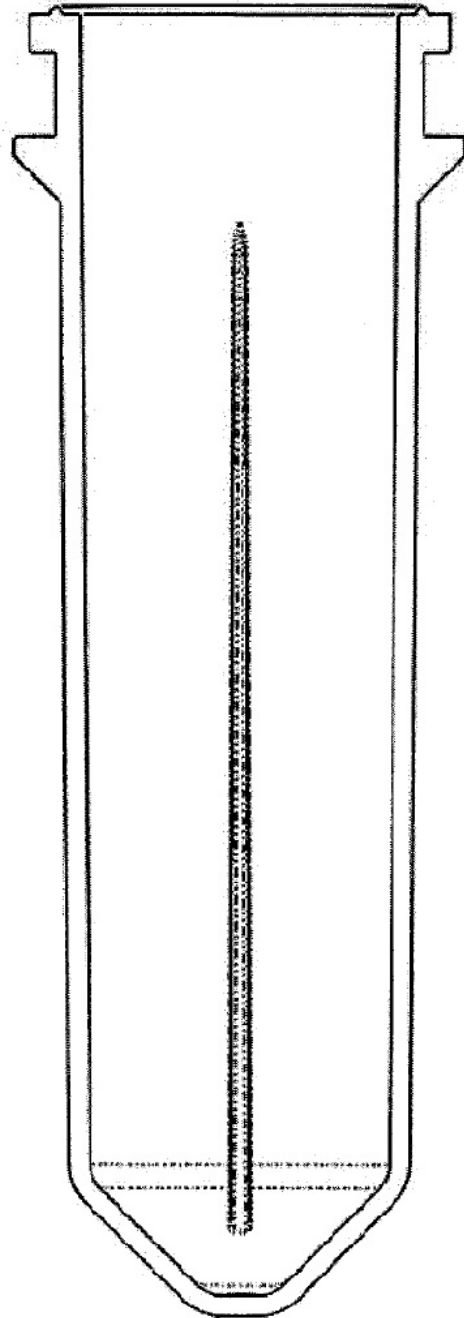


Figura 5B



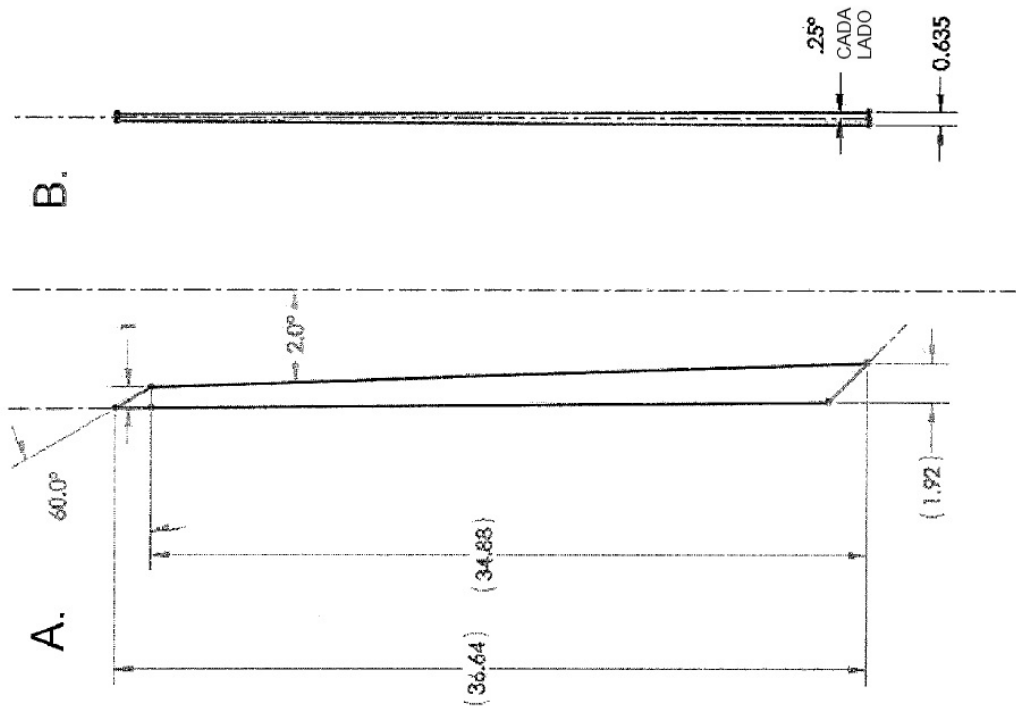


Figura 6



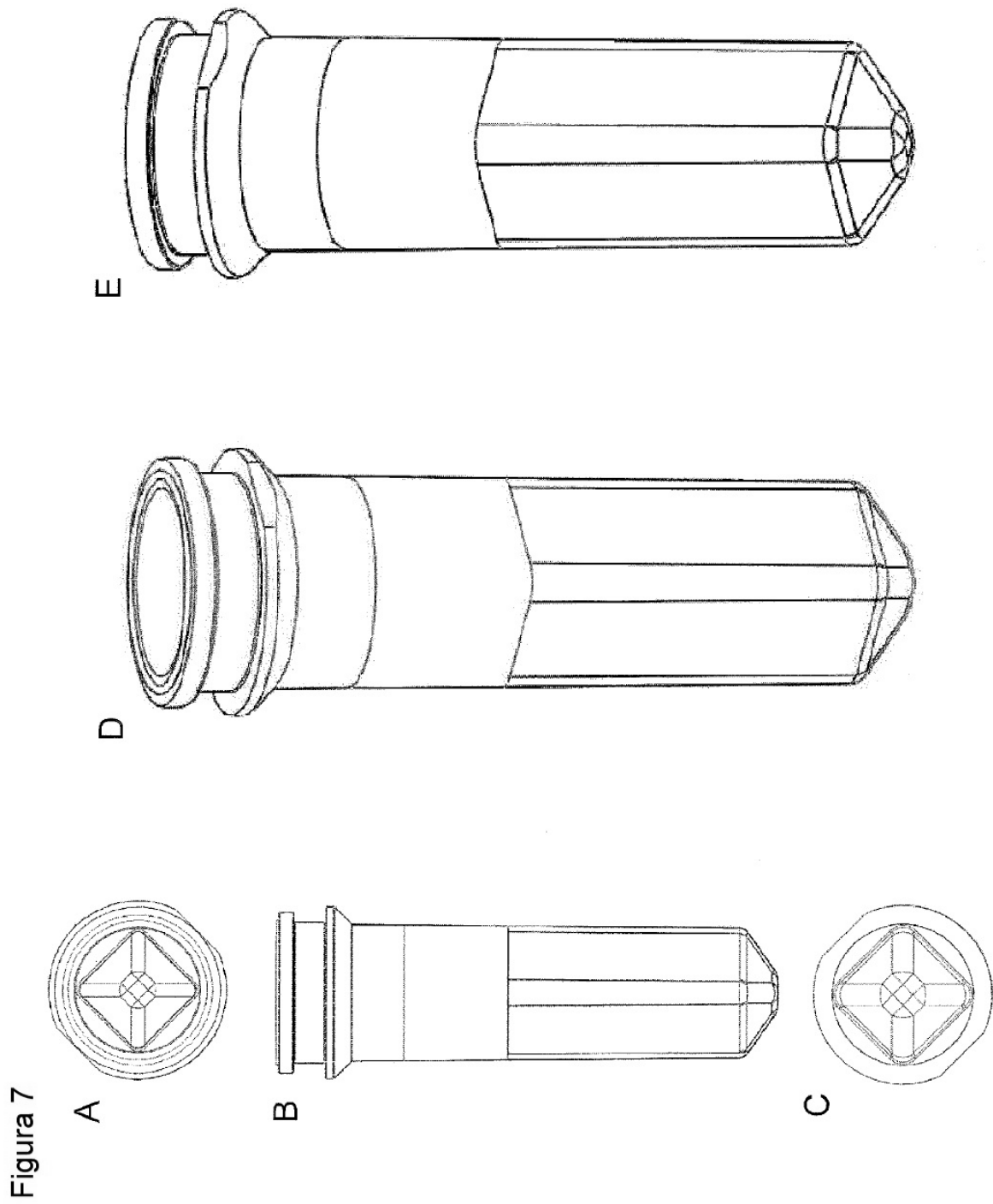


Figura 8

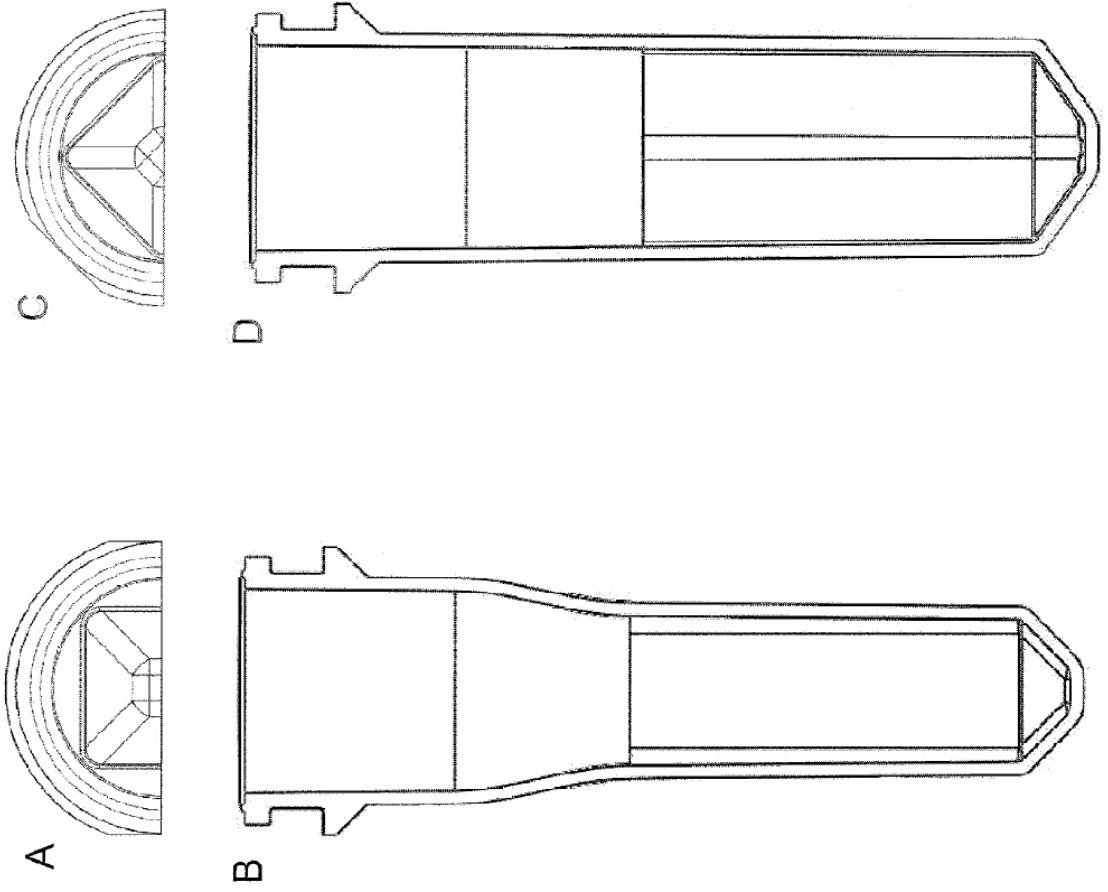


Figura 9

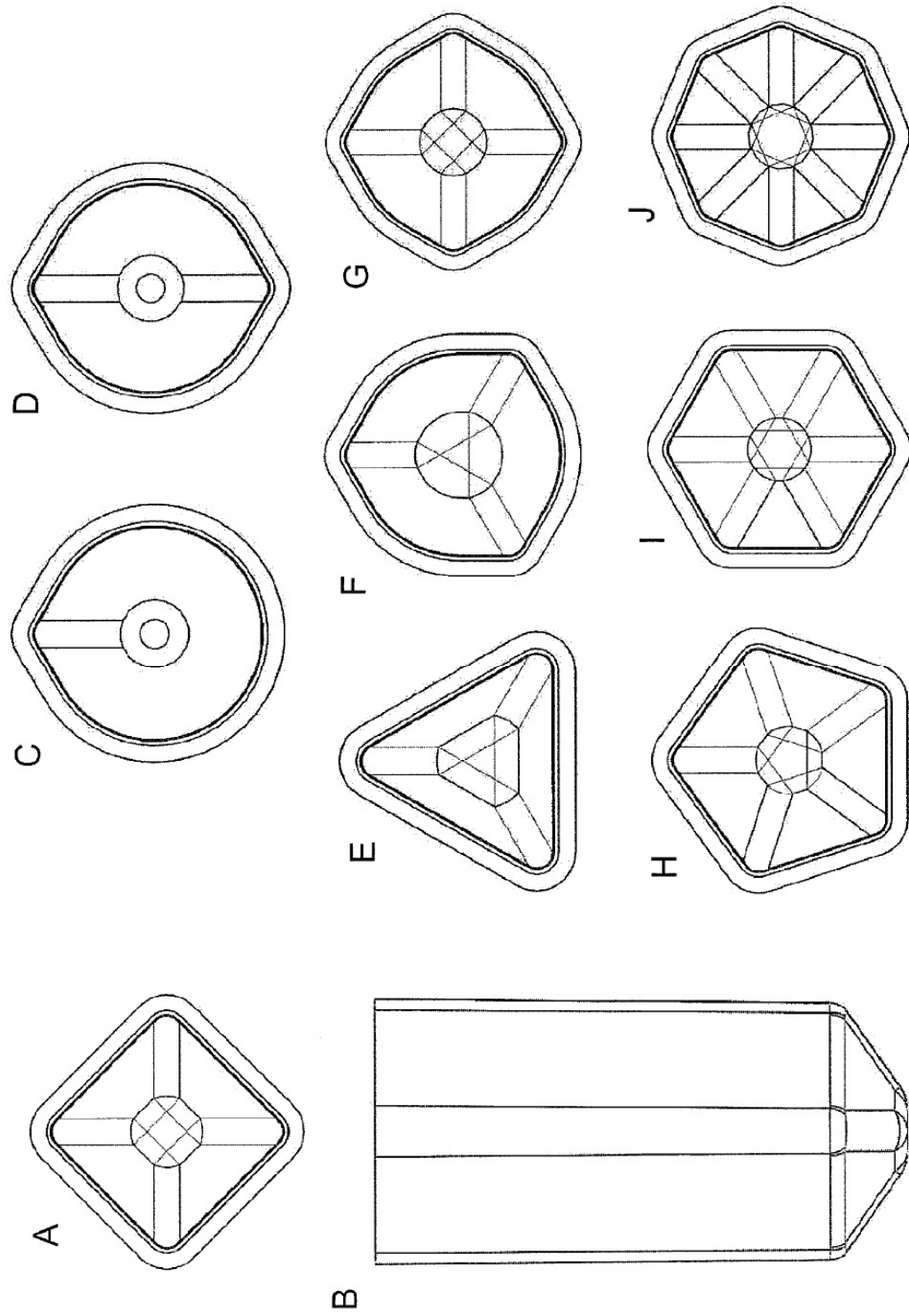


Figura 10

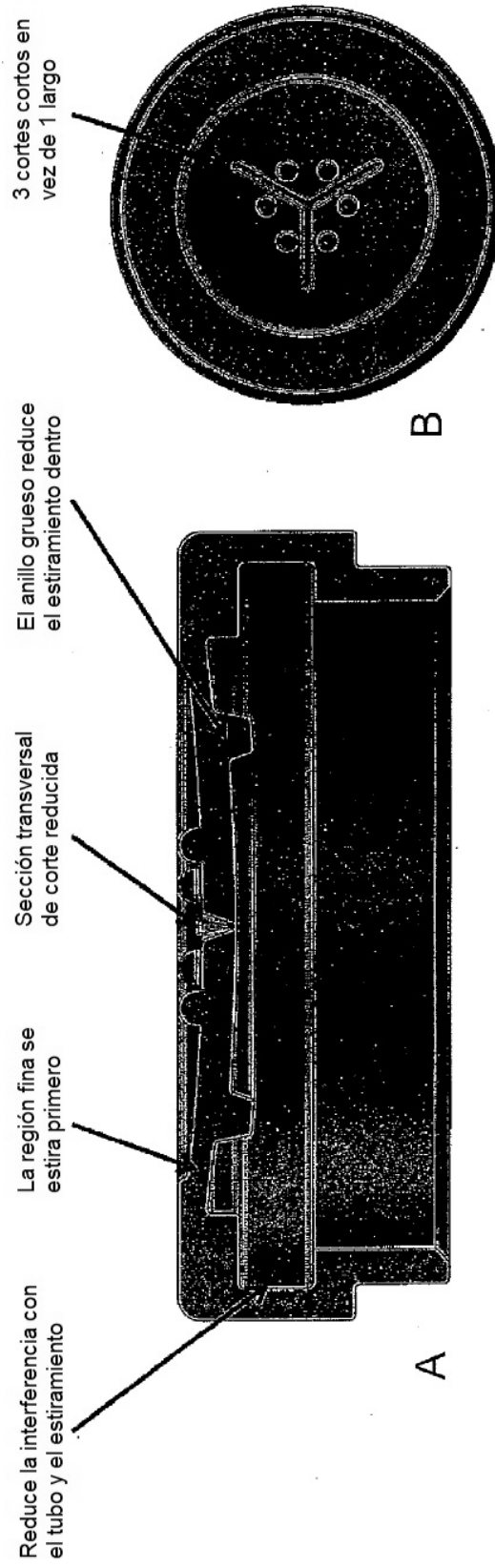


Figura 11

