



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 501**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/558** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04730419 .1**  
96 Fecha de presentación : **30.04.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1623042**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

54 Título: **Dispositivo oligocromático de un paso y procedimiento de uso.**

30 Prioridad: **07.05.2003 US 468805 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.08.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.08.2011**

73 Titular/es: **CORIS BIOCONCEPT S.P.R.L.**  
**rue Jean Sonet, 4A**  
**5032 Gembloux, BE**

72 Inventor/es: **Mertens, Pascal;**  
**Renuart, Ismaelle y**  
**Leclipteux, Thierry**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 501 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**

Dispositivo oligocromático de un paso y procedimiento de uso

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos y dispositivos para detectar analitos en muestras biológicas. Esta invención se refiere a ensayos rápidos y a ensayos rápidos típicos que incluyen "tiras reactivas", dispositivos de "flujo lateral" y dispositivos de "flujo a través"

**Estado de la técnica**

Se han desarrollado algunas aproximaciones para la detección de analitos en una muestra biológica para diagnósticos rutinarios en laboratorios a través de la inmunocromatografía.

- 10 Los documentos EP 0 088 636, EP 0 186 799, EP 0 284 232 y WO 88/08534, WO 03/033765 divulgan dispositivos cromatográficos en forma de lámina que comprenden al menos una primera y una segunda región. Los dispositivos de la técnica anterior presentados en estos documentos comprenden:

- 15 - una primera región que contiene material activo poroso para permitir que el líquido se mueva hacia la región sintetizada recubierta con los reactivos específicos. Esta primera región, denominada almohadilla de muestras, comprende sobre ella un reactivo de detección secado o impregnado dentro de ella. Además puede contener una región de aplicación y una (sub)región de absorción. La región de la almohadilla de muestras se denomina generalmente región de aplicación.

- 20 - una segunda región, también denominada región de detección, hecha de material poroso activo sobre el cual se absorben reactivos específicos. Algunos de estos reactivos pulverizados sobre una línea de la segunda región del dispositivo son directa o indirectamente específicos para el analito a detectar y deben reaccionar con el complejo de reactivos etiquetados para el analito de la muestra mientras otros reactivos no específicos eventualmente pulverizados sobre una línea adicional de la segunda región están dedicados a reaccionar con el exceso del reactivo de detección. Esta segunda región, hecha preferiblemente de nitrocelulosa, también puede contener una línea de control, preferiblemente detrás de la región de detección; y

- 25 - posiblemente también una tercera región hecha de material poroso dedicada a absorber el exceso de líquido que llega a través de las primera y segunda regiones. Esta región se denomina generalmente absorbente o región absorbente.

Algunas otras técnicas de detección conocidas en la técnica se refieren a la detección de moléculas producidas después de un proceso preliminar tal como una amplificación molecular o genética del analito.

- 30 La patente US 6.037.127 describe un procedimiento para detectar la presencia de un analito de ácido nucleico no desnaturalizado en una muestra de ensayo en el que la muestra de ensayo se pone en contacto con una tira de ensayo de un material poroso muy absorbente que es capaz de mover la muestra de ensayo lateralmente a lo largo de la tira de ensayo mediante migración capilar hasta su captura final por una molécula en una zona de captura específica.

**Objetivos de la invención**

- 35 La presente invención se dirige a suministrar una nueva e ingeniosa técnica de captura para la detección de moléculas de polinucleótidos posiblemente obtenidas después de pasos de amplificación molecular.

Un objetivo adicional de la invención es suministrar dispositivos que sean fáciles de manejar y que permitan una detección y/o una diagnosis rápida y exacta.

**Definiciones**

- 40 Iniciador: Oligonucleótido específico para el analito (usado para la amplificación, etiquetado para reaccionar con el reactivo de captura)

Conjugado: Sonda específica para el analito acoplada con una etiqueta en partículas directa.

Reactivo de captura: Reactivo que reaccionará específicamente con el oligonucleótido específico para el analito etiquetado.

- 45 Almohadilla absorbente: Primera región o almohadilla de muestras

Almohadilla de conjugado: Región que contiene el conjugado seco.

### **Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo cromatográfico en forma de lámina, en particular tiras reactivas, dispositivos de flujo a través y de flujo lateral, que tienen

- 5 - una región de aplicación (opcionalmente con almohadilla de conjugación),
- una región de detección (posiblemente con una parte de control (por ejemplo, líneas de control) y
- opcionalmente una región absorbente. La región de detección comprende al menos un reactivo de captura que reconoce específicamente un hapteno o péptido conjugado o acoplado con el oligonucleótido específico para el analito, y la región de aplicación comprende al menos un conjugado de sonda específica etiquetada (con etiqueta directa o indirecta) preferiblemente un oligonucleótido (ADN, ARN, APN, ALN) que se hibrida específicamente con el analito y que generalmente se denomina sonda. En caso de reacción positiva, es decir en el caso de que se forme un complejo entre dicho reactivo (de captura) específico y dicho analito específico acoplado en un hapteno o un péptido hibridizado con dicho conjugado específico, se genera una señal. Esta señal también se denomina señal específica. El oligonucleótido específico para el analito es uno de los iniciadores usados para la amplificación molecular del analito (S).

En una realización particular de la invención, la línea de control está hecha de una secuencia de oligonucleótidos que se hibrida con la sonda de conjugado específico.

- 20 El reactivo de captura puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento de anticuerpo hipervariable o una molécula que interactúa específicamente con el hapteno o el péptido o con cualquier conjugado de moléculas o se acopla con el oligonucleótido específico para el analito. La etiqueta de detección es preferiblemente un etiqueta en partículas directa, preferiblemente seleccionada entre el grupo que consta de coloides metálicos conjugados, partículas de látex conjugadas y micropartículas que tengan un color particular.

- 25 Preferiblemente el dispositivo cromatográfico en forma de lámina está compuesto de sustancias poliméricas laminadas sobre un polímero rígido. En una realización preferida, la región de aplicación comprende una membrana hecha de fibras de vidrio con una almohadilla de conjugado hecha de poliéster, la región de detección comprende una membrana hecha de nitrocelulosa y la región absorbente comprende una membrana hecha de celulosa. De acuerdo con otra realización, la región de aplicación y la almohadilla de conjugado están hechas del mismo material.

- 30 La presente invención se refiere además a procedimientos de detección que hacen uso de los dispositivos antes descritos, también denominados dispositivos oligocromatográficos, que pueden usarse para comprobar la presencia de secuencias de oligonucleótidos diana preferiblemente después de su amplificación. La detección puede realizarse a simple vista y/o automáticamente con la ayuda de un lector de tiras y programas de software específicos para la detección y/o cuantificación de analitos o amplicones.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos y realizaciones no limitativas, con referencia a las figuras adjuntas.

### **Breve descripción de la invención**

La figura 1 representa un ensayo positivo obtenido con el dispositivo de detección de la invención.

Las figuras 2a y 2b representan los diferentes pasos de detección de procedimiento de la invención.

### **Descripción detallada de la invención**

- 40 La presente invención se refiere en particular a dispositivos (1) de detección de analitos mejorados tanto dispositivos cromatográficos tales como dispositivos de tiras reactivas o de flujo lateral como sistemas de flujo a través y a su uso en la detección de analitos posiblemente presentes en una muestra tal como una muestra de líquido transparente. Los dispositivos preferidos comprenden una región (2) de aplicación, una región (3) de detección y posiblemente una región (4) de adsorción tal como se conoce en la técnica. La región de detección (3) puede contener una o más partes definidas, preferiblemente líneas, cada una de ellas dedicadas a la detección de un analito o grupo de analitos en particular. Puede incluirse una región de control, que posiblemente contiene varias partes (líneas). Los dispositivos de
- 45 la invención pueden ser dispositivos en forma de lámina de una pieza o pueden comprender varias partes en contacto capilar entre sí. Los dispositivos de flujo a través pueden considerarse también como una herramienta para la presente invención.

Los dispositivos de acuerdo con la presente invención están compuestos de sustancias poliméricas porosas que

5 preferiblemente están laminadas sobre un polímero semi-rígido para suministrar resistencia mecánica que facilite el manejo del dispositivo. La porosidad de las sustancias poliméricas debe ser tal que sea posible la migración capilar de un fluido y sus componentes desde la parte inferior hasta la parte superior de la tira, moviéndose a lo largo del conjugado rehidratado, sin ninguna obstrucción del flujo. Estas características son posibles por las propiedades hidrófilas de estos polímeros. Ejemplos de polímeros adecuados son la celulosa, la nitrocelulosa, el acetato de celulosa, las fibras de vidrio, el nylon, el copolímero/nylon acrílico, la poliétersulfona y el poliéster.

10 Un reactivo etiquetado específico (6), que es específico para el analito, sirve para detectar y/o cuantificar los analitos posiblemente presentes en una muestra de líquido transparente. El reactivo etiquetado específico (6) formará un complejo con el analito, dicho complejo es capturado entonces por un reactivo de captura específico (5). Este reactivo de captura (5) puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal o cualquier fragmento de anticuerpo hipervariable conocido en la técnica o cualquier otra molécula que pudiera unirse específicamente a una molécula complementaria tal como los haptenos, péptidos o proteínas (8) que pudieran reaccionar específicamente con el analito etiquetado. Estos reactivos pueden producirse mediante ingeniería genética.

15 Se conocen diferentes sistemas de detección en la técnica. Etiquetas en partículas (directas) coloreadas o visibles conocidas en la técnica incluyen las partículas (15) hechas de polímeros de látex, coloides metálicos tales como el oro, carbono, liposomas,... que pueden conjugarse con el reactivo de unión (6) que normalmente reacciona con el analito a detectar. Con ambos sistemas, es posible la cuantificación y/o la semi-cuantificación.

20 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección rápida y específica de la presencia de productos (7) de un ácido nucleico diana, preferiblemente después de la amplificación molecular de un analito. Puede usarse cualquier técnica de amplificación molecular, incluyendo aunque en sentido no limitativo PCR, RT-PCR, LCR o NASBA, para generar un producto amplificado (7). Los productos de ácido nucleico incluyen entre otras moléculas de ADN, ARN de cadena simple, de cadena doble o de cadena parcialmente doble. La estructura de las moléculas puede modificarse y/o puede incluir análogos de nucleótidos o de nucleósidos.

25 En una realización preferida de la invención, el conjugado de sonda específica comprende un conjugado de etiqueta (directa) visible (15) para una secuencia de polinucleótidos (ADN, ARN, APN, LNA) (6) que se hibrida específicamente con la secuencia diana específica (7). Hibridación específica quiere decir que la secuencia de polinucleótidos conjugados se hibridará bajo condiciones particulares (bien conocidas por las personas expertas en la materia) con el analito que podría estar presente en el líquido y no con otras secuencias de ácido nucleico. Así es posible detectar un analito particular dentro de una mezcla de compuestos, que posiblemente contiene varios otros analitos. El complejo formado entre la secuencia de oligonucleótidos de interés (7) y el conjugado de sonda específica se moverá al interior de la membrana de la segunda región (3) (preferiblemente nitrocelulosa) y alcanzará el reactivo (5) de captura (un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento de anticuerpo hipervariable conocido en la técnica o cualquier molécula que puede ser haptenos, péptidos o proteínas que podrían reaccionar específicamente con el analito etiquetado que está revestido sobre los mismos. La reacción entre el complejo (6-15) y su reactivo específico (5) revestido sobre la membrana será visualizada, ya que las partículas (15) se acumularán y generarán una señal visible. Esta señal permite al usuario evaluar que el proceso de polimerización se realiza correctamente y específicamente si se produjo un proceso de amplificación.

40 Así la presente invención se refiere en particular a un dispositivo que permite que el usuario compruebe en minutos si se ha efectuado o no una amplificación molecular específica. El dispositivo además puede permitir la cuantificación o semi-cuantificación de la cantidad de amplímeros producidos.

Más adelante, se proporcionan más detalles con respecto a aspectos generales y composiciones preferidas y la construcción de los dispositivos oligocromatográficos particulares de acuerdo con la presente invención.

Los dispositivos de acuerdo con la invención comprenden regiones de aplicación (2), detección (3) y absorbente (4) y opcionalmente una región de control (control interno) con una o más líneas de control.

45 En una realización preferida, la membrana de la región (2) de aplicación está hecha de fibras de vidrio con una almohadilla de conjugado hecha de poliéster, la membrana de la región de detección está hecha de nitrocelulosa por ejemplo de Advanced Microdevices Pvt, Ltd. También pueden utilizarse membranas de otro proveedor (por ejemplo, Schleicher & Schuell, Pall o Micropore). La membrana de la región absorbente preferiblemente está hecha de celulosa. En realizaciones particulares, la región de aplicación y la almohadilla de conjugado pueden estar hechas del mismo material. El conjugado, sin embargo, puede también estar directamente absorbido sobre la región de aplicación.

En otra realización preferida, la región (2) de aplicación está hecha de un polímero rígido al cual se adhiere una almohadilla de cubierta absorbente hecha de fibras de vidrio, que absorbe y conduce el líquido de la muestra hasta la región de detección. Las fibras de vidrio además pueden cubrir una almohadilla de conjugado hecha de poliéster que contiene el conjugado de forma seca. También esta almohadilla debe tener unas características tales que el conjugado

sea fácilmente hidratado por el líquido de la muestra para permitir una completa separación del conjugado hidratado y la reacción específica de los reactivos del conjugado con su analito específico.

5 La almohadilla de conjugado puede estar parcial o completamente cubierta por la almohadilla de la muestra. Tanto la almohadilla de la muestra como la almohadilla de conjugado pueden ser del mismo material. En este caso, el conjugado podría pulverizarse directamente sobre el polímero que se usa también para absorber el líquido de la muestra.

10 La almohadilla de conjugado se impregna con partículas que están recubiertas con algunos compuestos que podrían incluir proteínas, péptidos, haptenos, polisacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos, ANP o ANL u otras moléculas poliméricas que puedan hibridarse específicamente con ADN y/o ARN. Estos compuestos reaccionarán de alguna manera específicamente con los analitos que podrían estar presentes dentro de las muestras a analizar. Ejemplos de partículas incluyen partículas coloidales de oro, partículas coloidales de azufre, partículas coloidales de selenio, partículas coloidales de sulfato de bario, partículas coloidales de sulfato de hierro, partículas de iodato metálico, partículas de aluro de plata, partículas de sílice, partículas coloidales de óxido (hidroso) metálico, partículas coloidales de sulfuro metálico, partículas coloidales de seleniuro de plomo, partículas coloidales de seleniuro de cadmio, partículas coloidales de fosfato metálico, partículas coloidales de ferrita metálica, cualquiera de las partículas coloidales anteriormente mencionadas recubiertas con capas orgánicas o inorgánicas, moléculas de proteínas o péptidos, liposomas, micropartículas coloreadas o partículas de látex de polímeros orgánicos.

20 En una realización preferida, las partículas son partículas coloidales de oro con un diámetro de aproximadamente entre 5 y 40 nm. Preferiblemente, se usan partículas con un diámetro de aproximadamente 20 nm o aproximadamente 40 nm. Podrían usarse gránulos de látex de poliestireno que hayan sido activados con algunas funciones químicas tales como carboxilo, amino, hidroxilo y sulfhidrilo. En una realización preferida, se utilizan partículas de látex de amino o sulfhidrilo carboxilado (sin limitaciones).

25 Alternativamente, pueden usarse micropartículas coloreadas. Para realizar una detección multicolor de la PCR multiplex o cualquier otras secuencias nucleotídicas diferentes, pueden acoplarse sondas de oligonucleótidos a micropartículas diferentemente coloreadas. Cada sonda de oligonucleótidos, específica para un ácido nucleico diana en particular, se asociará entonces con un color en particular (por ejemplo, rojo para el analito A y azul para el analito B).

30 Están disponibles diferentes reactivos de reticulación para el acoplamiento específico de grupos funcionales, presentes sobre micropartículas, para un oligonucleótido modificado. Un procedimiento es el acoplamiento covalente de un oligonucleótido modificado con amino con micropartículas modificadas con COOH que pueden adquirirse en diferentes fabricantes y existen en diferentes colores y diámetros. Los oligonucleótidos modificados con amino pueden acoplarse con estas micropartículas modificadas con COOH a través del uso de agentes de acoplamiento específicos como, por ejemplo, carbodiimido (con o sin éster de hidroxisuccinimido). Las moléculas de acoplamiento con, por ejemplo, un grupo carboxilo, amino o sulfhidrilo (naturalmente presente o químicamente sintetizado) a través del uso de reactivos de reticulación homo o hetero bifuncionales están ya descritas en la técnica.

35 Las partículas a utilizar en el dispositivo oligocromatográfico de la invención se recubren con compuestos que bien se unen específicamente con el analito a detectar o bien se unen específicamente con compuestos que reaccionarán con un reactivo que ha sido recubierto sobre la región de detección. En una realización preferida, el analito a detectar consta de secuencias amplificadas de ácido nucleico.

40 El uso de oligonucleótidos etiquetados (por ejemplo los oligonucleótidos etiquetados con haptenos, biotina o digoxigenina) como iniciadores para permitir la detección de productos amplificados también es bien conocido en la técnica. También se describen oligonucleótidos etiquetados con péptidos. En la presente invención, los oligonucleótidos etiquetados con péptidos o haptenos se utilizan como iniciadores en una reacción de amplificación de ácido nucleico o en pasos de amplificación molecular, y entonces se usa un reactivo dirigido contra dicho hapteno o péptido para detectar la formación de amplímeros, como indicación de la presencia de un analito en una muestra de ensayo.

45 Se sabe en la técnica cómo generar inmunorreactivos específicos contra un péptido antigénico o un hapteno. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra haptenos, tales como la digoxigenina y por ejemplo la biotina, se pueden conseguir fácilmente en el campo de la técnica.

50 El revestimiento se realiza preferiblemente diluyendo el reactivo en un neutralizador apropiado y distribuyéndolo sobre la membrana, preferiblemente nitrocelulosa, con un sistema de contacto (por ejemplo, IsoFlow de Imagen Technology). La distribución de velocidad podría variar desde aproximadamente 50 mm hasta aproximadamente 10 mm/segundo pero preferiblemente se fija en aproximadamente 40 mm/segundo o incluso mejor 30 mm/segundo. El volumen del material distribuido varía desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3  $\mu\text{l}/\text{cm}$ , preferiblemente desde

aproximadamente 0,7 hasta aproximadamente 2  $\mu\text{l}/\text{cm}$  y más exactamente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2  $\mu\text{l}/\text{cm}$ .

5 La concentración de reactivo varía entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/ml y preferiblemente es aproximadamente un mg/ml. En una realización preferida de la invención, el neutralizador utilizado para este revestimiento consta de una solución salina (NaCl) neutralizada con fosfato hasta aproximadamente un pH de 7,2.

En una realización de la invención, el dispositivo incluye una región absorbente que aspira la solución que ha sido transportada mediante acción capilar hasta el extremo de la nitrocelulosa. Ejemplos de substancias incluyen celulosa y fibras de vidrio. Preferiblemente se han utilizado la celulosa (MDI) o la fibra de vidrio de borosilicato (Schleicher & Schuell).

10 En una realización particular de acuerdo con esta invención, el conjugado de oro se impregna dentro de una membrana sólida inerte que podría ser poliéster o nylon. Se prefiere el poliéster. Las membranas de poliéster aquí utilizadas tienen un tamaño de 27 x 260 mm y son de Advanced Microdevices Pvt, Ltd (India). Las membranas se impregnan con el conjugado de oro después de un paso de disolución en un neutralizador específico para suministrar una rehidratación óptima con la muestra de líquido cuando se efectúa el ensayo. Las membranas AccuFlow G de Schleicher & Schuell también son útiles para este propósito y ofrecen la ventaja de que el conjugado se pulveriza directamente sobre la matriz de la muestra.

20 Cuando se usan las membranas de poliéster de Advanced Microdevices Pvt, las membranas se impregnan sumergiéndolas dentro de un vial adecuado con un volumen finito que es aproximadamente 1,6 ml pero que podría reducirse hasta 1,3 ml dependiendo del sistema de impregnación utilizado. Las membranas se dejan secar a temperatura ambiente toda la noche. Luego se secan en un horno a aproximadamente 55° C durante aproximadamente 20 minutos. Después del secado, esas membranas se almacenan en cajas específicas con desecantes bajo una humedad relativa máxima del 10%. Las membranas se cortan en piezas de aproximadamente 5 mm de ancho y se pegan sobre la parte del adhesivo de los laminados. Luego se pega un papel absorbente hecho de fibras de vidrio o cualquier otro material absorbente sobre la parte del adhesivo de la tira para cubrir fuertemente la membrana de poliéster para permitir que el líquido rehidrate el conjugado y lo haga reaccionar con los antígenos presentes en la muestra.

25 Cuando se utilizan las membranas AccuFlow G, el conjugado se pulveriza con el sistema IsoFlow Atomizing Nozzle de Imagen Technology. En este caso, el conjugado se pulveriza a una velocidad de 50 mm/segundo para cantidades pulverizadas que oscilan entre 0,8  $\mu\text{l}/\text{mm}$  y 1,67  $\mu\text{l}/\text{mm}$  con una presión que oscila entre 1 y 20 psi.

30 En una realización particular adicional de acuerdo con la invención, los oligonucleótidos se acoplan con las partículas coloidales de oro. El tamaño de las partículas de oro podría variar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 nm, pero preferiblemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 nm. En esta descripción, se han usado partículas de aproximadamente 20 nm. El conjugado de oligonucleótidos se procesa entonces para secarse bien sobre la almohadilla de conjugado de poliéster o directamente sobre el material de la muestra según se describió anteriormente.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1: Detección de *Toxoplasma gondii***

#### **Preparación de partículas coloidales de oro**

40 Se prepararon partículas coloidales de oro de aproximadamente 20 nm mediante reducción de ácido tetracloroáurico con citrato de sodio. Doscientos ml de agua ultrapura que contenía aproximadamente 60 mg de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se calentaron hasta el punto de ebullición y se añadieron aproximadamente 5 ml de una solución de citrato de sodio dihidrato al 4%. Se continuó la ebullición durante unos pocos minutos, hasta que se obtuvo una solución rojo oscuro. La solución se dejó equilibrar a temperatura ambiente antes de su uso. Se midió el  $\text{OD}_{520\text{nm}}$  para evaluar la concentración de partículas en la solución.

#### **Acoplamiento de oligonucleótidos a partículas coloidales de oro**

50 El acoplamiento de oligonucleótidos a partículas coloidales de oro es bien conocido en la técnica. Los oligonucleótidos etiquetados con tiol reaccionan con partículas coloidales de oro. En el presente caso, oligonucleótidos modificados en el amino 5' se modificaron mediante N-succinimidil S-acetilpropionato (SATP) para obtener oligonucleótidos con un grupo sulfhidrilo (tiol) protegido. Este grupo sulfhidrilo protegido se desprotegió más adelante. Estas reacciones se llevaron a cabo esencialmente según describe el fabricante del SATP (Pierce, Rockford, IL). Se usaron dos oligonucleótidos como sondas en el dispositivo oligocromatográfico para la toxoplasmosis: uno específico para el gen diana del *T. gondii* (5' CCCTCTGCTGGCGAAAAGTG 3') y uno específico para el control interno (5' AGGGTCTACTA-

CTGGGTTACCTG 3').

Brevemente, los oligonucleótidos modificados en el amino 5' en 50 mM de fosfato de sodio, 1mM de neutralizador EDTA, pH 7,5 se mezclaron con diez veces de exceso molar de SATP y la reacción tuvo lugar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de SATP mediante desalación en una columna de cromatografía de exclusión (NAP-5, Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. El oligonucleótido etiquetado con SATP se eluyó en 50 mM de fosfato de sodio, 1mM de neutralizador EDTA, pH 7,5. Los oligonucleótidos etiquetados con SATP pueden almacenarse a -20° C hasta que se necesiten. Subsiguientemente se realizó la desprotección añadiendo hidroxilamino (0,5 M de concentración final) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de hidroxilamino mediante desalación. Los oligonucleótidos etiquetados con tiol resultantes se mezclaron con partículas coloidales de oro (a 4,2 OD<sub>520nm</sub>/ml, concentración final) durante 24 horas. Entonces se añadió fosfato de sodio con un pH de 7,0 a una concentración final de 10 mM y NaCl a una concentración final de 0,1 M. La mezcla se incubó durante otras 24 horas. Entonces se añadió NaCl a una concentración final de 0,2 M y la mezcla se incubó durante 16 horas. El exceso de oligonucleótido se eliminó mediante centrifugación y se realizaron dos lavados sucesivos de las partículas de oro comprimidas con 10 mM de fosfato de sodio, 0,3 M de neutralizador de NaCl, pH 7,0. Los conjugados de oligonucleótido – oro se almacenaron finalmente en el mismo neutralizador.

### El dispositivo oligocromatográfico

El dispositivo oligocromatográfico (1) que se utilizó en el presente ejemplo consta de un soporte sólido (17) de respaldo tal como un elemento de plástico con una región (2) de aplicación sobre el mismo hecha preferiblemente de una almohadilla de conjugado con poliéster de MDI, una región (3) de detección preferiblemente hecha de nitrocelulosa y una región (4) de adsorción preferiblemente hecha de celulosa.

Estos materiales están ventajosamente presentes en ambos lados (11, 12) del plástico (17). Un lado, denominado lado (11) de prueba se dedica a la detección del polinucleótido diana (T. gondii). El otro lado, denominado lado (12) de control, se dedica a la detección de un control interno de amplificación y también tiene elementos (16) de control de la migración. Sobre el lado (11) de prueba, la membrana de nitrocelulosa se ha sensibilizado preferiblemente con neutralita avidina. El conjugado de sonda oligonucleotídica específica se impregna en la membrana de poliéster (MDI) de la región (2) de aplicación del lado (11) de prueba.

Sobre el lado (12) de control, la membrana de nitrocelulosa tiene dos líneas (19, 18). La línea inferior (18) de prueba de amplificación de control interno, está preferiblemente sensibilizada con neutralita avidina. Preferiblemente, la línea superior (19) de prueba de migración está sensibilizada con el oligonucleótido de control de migración cuya secuencia (5' CAGGTAACCCAGTAG 3') es anti-paralela a la de la sonda de control interno. Para este revestimiento, el oligonucleótido de control de la migración, biotinilado en 5', se mezcla con neutralita avidina usada como proteína portadora. El conjugado de la sonda oligonucleotídica específica de control interno (14, 15) se impregna en la membrana de poliéster (MDI) de la región (2) de aplicación de este lado (12) de control (figura 2b).

### Amplificación de control interno

El control interno está diseñado para mostrar si un resultado negativo de prueba de T. gondii es un negativo verdadero, es decir que el negativo no es el resultado de una sustancia inhibidora de la amplificación posiblemente presente en la muestra ensayada. Este control interno es una plantilla que se añade a la mezcla de reacción antes de la amplificación y debe amplificarse al menos en la ausencia del gen diana del T. gondii a menos que una sustancia inhibidora esté presente en la muestra. La plantilla de control interno es un oligonucleótido que fue diseñado con los siguientes criterios:

- (casi) la misma longitud que el amplímero diana
- (casi) el mismo contenido de G/C que el amplímero diana
- amplificado con los mismos iniciadores oligonucleotídicos que el amplímero diana
- en la parte interna de esta plantilla de control interno, la secuencia de la sonda del gen diana del T. gondii se sustituye por la secuencia de la sonda de control interno. De esta forma, la sonda específica para el T. gondii no se hibrida con el amplímero de control interno y la sonda de control interno no se hibrida con el amplímero del gen diana del T. gondii.

Siguiendo este criterio, la secuencia de la plantilla de control interna Toxo es: 5' GGTTCAGTCACTGAC-GAGCTCAGGGTCTACTGGGTTACCTGAAAGTCATGAGTATCTG TGCAACTTTGGTGTATTTCGCAGATTGGTTCG 3' (la secuencia de la sonda de control interno está subrayada).

La cantidad de plantilla de control interno Toxo a añadir a la mezcla de amplificación se ha de determinar de forma que permita la amplificación de este control interno en todos los casos (24/24) en ausencia de la muestra. Los inventores

también mostraron que, en la presencia de SDS al 0,01% usado como inhibidor moderado, el control interno no detectó nada más después de la PCR.

#### Extracción de ADN

5 La extracción de ADN de las muestras que contenían *T. gondii* se realizó usando el equipo de “EXTRAcell DNA extraction” (Bioline, Torino, Italia) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN puede extraerse por cualquier otro procedimiento, bien comercialmente disponible o bien descrito en la literatura científica. El ADN extraído se utiliza directamente después de la extracción o se mantiene a -20° C hasta su uso.

#### Amplificación del ADN diana

10 Se realizó la amplificación del gen B1 del *T. gondii* mediante PCR con un iniciador inverso etiquetado con biotina. La mezcla de reacción (45 µl por reacción) contiene los siguientes materiales (las concentraciones finales se indican igual que para la mezcla que incluye la muestra de 5 µl):

- cada uno de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) a una concentración final de 0,1 mM (para cada uno)

- neutralizador de PCR que incluye MgCl<sub>2</sub>, concentración final 1x (Sigma)

- Taq polimerasa (2 unidades) (Sigma)

15 - plantilla de oligonucleótido de control interno, 1,67 10<sup>-22</sup> mol.

El iniciador directo (5' GGTTGCAGTCACTGACGAGC 3') se utilizó a una concentración final de 0,1 µM y el iniciador inverso etiquetado con biotina (5' CGACCAATCTGCGAATACACC 3') a una concentración final de 0,4 µM.

Puede utilizarse hasta 5 µl de ADN extraído para realizar la amplificación. Si se usa menos de 5 µl, se añade agua de calidad de biología molecular para alcanzar un volumen de reacción total de 50 µl.

20 La amplificación se realiza con los siguientes ciclos térmicos:

- 5 minutos a 94° C

- 45 ciclos (20 segundos a 94° C, 20 segundos a 55° C, 30 segundos a 72° C)

- un minuto a 72° C

- 30 segundos a 94° C

25 Los productos amplificados se almacenan a 4° C hasta su posterior utilización.

#### Detección del *T. gondii*

30 Entre 40 y 50 µl del producto amplificado se introdujo en un tubo que contiene tres veces este volumen de neutralizador oligocromatográfico preequilibrado a 55° C. La tira oligocromatográfica se pone dentro del tubo inmediatamente y el tubo de ensayo se cierra. La cromatografía se realiza durante hasta 10 minutos (manteniéndose el tubo a 55° C en un bloque calentador u otro dispositivo). El producto amplificado migra al interior de la tira y se rehidratan las sondas de oligonucleótidos conjugadas con oro en seco. En el lado de prueba de la tira, la sonda se hibrida específicamente con el producto amplificado del gen diana del *T. gondii*. Entonces el complejo migra a la nitrocelulosa y el complejo es capturado por la neutralita avidina a través de la etiqueta de biotina presente en el producto amplificado (etiquetándose con biotina el oligonucleótido inverso en la amplificación). La captura del complejo ocasiona una señal positiva, es decir, una línea en la que se acumulan las partículas coloidales de oro para dar un color que va del rosa al púrpura.

35 Sobre el lado de control de la tira, el conjugado de sonda interno se hibrida específicamente con el producto amplificado de control interno. Entonces el complejo migra a la nitrocelulosa y el complejo es capturado por la neutralita avidina inmovilizada (amplificándose el control interno con el mismo oligonucleótido inverso etiquetado con biotina). La captura del complejo ocasiona una señal positiva. El conjugado de sonda de control interno restante que no ha reaccionado migra hacia la línea de control de migración en la que se hibrida con el oligonucleótido de control de migración inmovilizado, ocasionando una señal positiva.

40

#### Ejemplo 2: Detección de toxinas STX1 y STX2 de la extracción de ADN de *E. coli*157:H7

45 Se realizó la extracción de ADN de muestras de cultivo de *E. coli* con o sin genes *stx1* y *stx2* usando el equipo de “EXTRAcell DNA extraction” (Bioline, Torino, Italia) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN puede extraerse mediante cualquier otro procedimiento, bien comercialmente disponible o bien descrito en la literatura científica. El ADN extraído se usa directamente después de la extracción o se mantiene a -20° C hasta su uso. Las cepas de *E. coli*



testadas incluían cepas ATCC números 35150, 43890 y 25922 (incorporadas aquí por referencia) como controles positivo y negativo, respectivamente.

#### Tira oligocromatográfica para stx1 – stx2

5 Se construyó una tira reactiva oligocromatográfica para la detección específica para los genes stx1 y stx2 de acuerdo con el lado de prueba de la tira oligocromatográfica para la detección específica del gen B1 amplificado de la *T. gondii*, excepto que se mezclaron dos sondas de oligonucleótidos etiquetadas con oro coloidal para los productos amplificados del stx1 y stx2 y se secaron en la almohadilla de conjugado. Las secuencias de las sondas de oligonucleótidos son las siguientes:

N-STX1-F2: 5'-CTTCTTATCTGGATTAATG-3' (SEQ ID NO: 1) para la detección del gen stx1 amplificado

10 N-STX2-F3: 5'-TCTGTGTATACGATGACGCC-3' (SEQ ID NO: 2) para la detección del gen stx2 amplificado

Ambos oligonucleótidos contienen un amino en la posición 5'. La modificación de este amino en un grupo tiol para el acoplamiento de las partículas coloidales de oro se realizó según se describió anteriormente.

#### Amplificación de los genes stx1 y stx2

15 Para detectar ambos genes stx1 y stx2 del *E. coli* que codifican, respectivamente, la toxina I y II, similares a la toxina Shiga, se han amplificado secuencias internas de estos genes usando los iniciadores de oligonucleótidos descritos por Paton y Paton (J. Clin. Microbiol., febrero 1998, vol. 36 (2); 598 – 602). Los iniciadores directo e inverso para la amplificación del stx1 son stx1-F (5'-ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC-3', SEQ ID NO: 3) y stx1-R-biot (5' GAACG-CCCCTGAGATCATC-3', SEQ ID NO: 4), respectivamente.

20 El iniciador stx1-R-biot está biotinilado en la posición 5'. Los iniciadores directo e inverso para la amplificación del stx2 son stx2-F (5'-GGCACTGTCTGAACTGCTCC-3', SEQ ID NO: 5) y stx2-R-DIG (5'-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG-3', SEQ ID NO: 6), respectivamente. El iniciador stx2-R-DIG comprende un grupo de digoxigenina en la posición 5'.

La mezcla de amplificación (50 µl por reacción) contiene los siguientes materiales:

- cada uno de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) a una concentración final de 0,3 mM

- neutralizador de PCR, concentración final 1x (Sigma)

25 - Taq polimerasa, una unidad (Sigma).

Cada uno de los iniciadores directos se utilizó a una concentración final de 0,1 µM y cada uno de los iniciadores inversos a una concentración final de 0,5 µM.

Pueden usarse hasta 5 µl de ADN extraído para realizar la amplificación.

La amplificación se realizó con los siguientes ciclos térmicos:

30 - 5 minutos a 94° C

- 35 ciclos (30 segundos a 94° C, 30 segundos a 55° C, 45 segundos a 72° C)

- 2 minutos a 72° C

- 30 segundos a 94° C

- almacenamiento a 4° C hasta su uso

#### 35 Comprobación oligocromatográfica para los genes stx1 y stx2

40 El ensayo oligocromatográfico para la detección de los genes amplificados stx1 y/o stx2 se realizó de forma similar a la detección del gen B1 del *T. gondii* excepto en que se utilizó la tira específica para stx1 - stx2. En esta tira, dos "receptores" se encuentran revestidos sobre la nitrocelulosa: un anticuerpo se une específicamente a la digoxigenina y capturaré todas las moléculas etiquetadas con digoxigenina, comprendiendo el gen amplificado stx2 en el complejo con la sonda etiquetada con oro coloidal de stx2. El segundo receptor es neutralita - avidina y se une específicamente a la biotina y capturaré todas las moléculas etiquetadas con biotina, comprendiendo el gen amplificado stx1 en complejo con la sonda etiquetada con oro coloidal de stx1.

50 µl del producto amplificado se introdujo en un tubo que contenía el mismo volumen (50 µl) de neutralizador

oligocromatográfico calentado a 55° C. La tira inmunocromatográfica de stx1 – stx2 se pone en el tubo inmediatamente y se realiza la cromatografía durante hasta 10 minutos (manteniéndose el tubo a 55 ° C en un bloque térmico u otro dispositivo). El producto amplificado migra al interior de la tira y las dos sondas de oligonucleótidos conjugadas con oro secas se rehidratan y las sondas se hibridan específicamente con los productos amplificados. Entonces los complejos migran a la nitrocelulosa y los complejos son capturados específicamente por los anticuerpos anti-hapteno inmovilizados a través de las etiquetas de hapteno. La captura del complejo de stx1 origina una señal positiva sobre la línea recubierta con neutralita – avidina. Es decir una banda en la que se acumulan las partículas coloidales de oro dan un color a la línea que va del rosa al púrpura. La captura del complejo de stx2 origina una señal positiva sobre la línea revestida con anti-digoxina, es decir una banda en la que se acumula las partículas coloidales de oro para dar a la línea un color que va del rosa al púrpura.

Todos los resultados obtenidos mediante el procedimiento oligocromatográfico estuvieron de acuerdo con los resultados obtenidos mediante los análisis de los amplímeros de la PCR sobre gel de agarosa y con el estado conocido de la referencia y otras cepas analizadas.

El segundo ejemplo muestra la detección de ARM de SARS – CoV.

### 15 **Ejemplo 3: Detección del virus SARS – CoV**

#### **Preparación de las partículas coloidales de oro**

Se prepararon partículas coloidales de oro de aproximadamente 20 nm según se describió anteriormente.

#### **Acoplamiento de los oligonucleótidos con las partículas coloidales de oro**

Los oligonucleótidos utilizados como sondas en el dispositivo oligocromatográfico para el SARS – CoV se acoplaron con las partículas coloidales de oro según se describió anteriormente. Estos oligonucleótidos son los siguientes: uno específico para el gen diana del SARS – CoV (5' CCCTCTGCTGGCGAAAAGTG 3') y uno específico para el control interno, el mismo que para el control interno del T. gondii ((5' AGGGTCTACTACTGGGTACCTG 3').

#### **El dispositivo oligocromatográfico**

El dispositivo oligocromatográfico que se utilizó en este momento es muy similar al dispositivo utilizado para la detección de amplímeros del T. gondii. El lado de control es idéntico al de la tira oligocromatográfica para el T. gondii. En el lado de prueba, la membrana de nitrocelulosa se sensibilizó con neutralita avidina. El conjugado de sonda oligonucleotídica específica para el SARS - CoV se impregna en la membrana de poliéster (MDI) de la región de aplicación de este lado de prueba.

#### **Control interno de RT - PCR del SARS – CoV**

El control interno se diseñó para mostrar si un resultado negativo de la prueba del SARS - CoV es un negativo verdadero, es decir que el resultado negativo no es debido a la transcripción inversa o a una sustancia inhibidora de la amplificación posiblemente presente en la muestra ensayada. Este control interno es una plantilla de ARN que se añade a la mezcla de reacción antes de la RT - PCR y debe retro-transcribirse y amplificarse al menos en la ausencia del gen diana del SARS - CoV, a menos que una sustancia inhibidora esté presente en la muestra. La plantilla de control interno es una plantilla de ARN. Este ARN se diseñó de forma que el amplímero de control interno coincidiera con los siguientes criterios:

- la misma longitud que el amplímero diana

- el mismo contenido de G/C que el amplímero diana

- retro-transcrito y amplificado con los mismos iniciadores oligonucleotídicos que el amplímero diana

- la parte interna de esta plantilla de control interno, la secuencia de la sonda del gen diana de SARS - CoV, se sustituye por la secuencia de la sonda de control interno. De esta forma, la sonda específica para el SARS - CoV no se hibrida con el amplímero de control interno y la sonda de control interno no se hibrida con el amplímero del gen SARS - CoV. El ARN de la plantilla de control interno se produjo mediante transcripción *in vitro* usando polimerasa de ARN T7 según describía el fabricante (Epicentre).

La plantilla usada para esta transcripción *in vitro* era ADN de doble cadena cuya secuencia comprendía una secuencia promotora para la polimerasa del ARN T7 seguida por la secuencia de una plantilla de ARN de control interno a producir. La secuencia de este ADN de doble cadena fue la siguiente (la secuencia que se corresponde con la transcripción de ARN está subrayada):

**5' TAATACGACTCACTATAGGGAGGCACCCGCGAAGAAGCTATTCTTTA**  
**GGGTCTACTGGGTACCTGCCGGATGTAGAGGGCTGTCATGCAA 3' .**

5 La cantidad de ARN de plantilla de control interno para el SARS - CoV a añadir a la mezcla de la RT - PCR debe permitir la retro-transcripción y amplificación de este control interno en todos los casos en la ausencia de muestra.

**Extracción de ADN**

La extracción de ARN de las muestras sospechosas de contener SARS - CoV puede realizarse mediante cualquier procedimiento, bien comercialmente disponible o bien descrito en la literatura científica. El ARN extraído se usa directamente después de la extracción o se mantiene a -80° C hasta su uso.

10 **Amplificación del ARN diana**

15 La amplificación del gen diana del SARS - CoV se realizó mediante RT - PCR con un iniciador inverso etiquetado con biotina secuencia: (5' TTGCATGACAGCCCTCTACATC 3') y un iniciador directo no etiquetado (secuencia: 5' CACCCGCGAAGAAGCTATTC 3'). El iniciador inverso actúa tanto como iniciador para la transcripción inversa específica para la diana como para la amplificación mientras que el iniciador directo actúa solamente para la reacción de amplificación. La RT - PCR se efectuó con el equipo "One-Step RT - PCR kit" de Qiagen, básicamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Brevemente, una reacción RT - PCR de 50 µl contiene los siguientes componentes:

- Neutralizador Qiagen One-Step RT - PCR, 5 x concentrado: 10 µl
- 10 mM de dNTPMix del equipo de Qiagen: 2 µl
- 20 - Oligo directo: 0,15 µM de concentración final
- Oligo inverso: 0,6 µM de concentración final
- Mezcla de enzimas del equipo de Qiagen: 2 µl
- Plantilla de ARN de control interno: dilución del ARN transcrito *in vitro* a determinar para cada lote de ARN
- Muestra (ARN extraído): de 1 µl a 5 µl
- 25 - Agua de calidad de biología molecular (libre de ribonucleasa y de desoxiribonucleasa): hasta un volumen final de 50 µl.

La mezcla de reacción se mantiene en hielo hasta el inicio de la RT - PCR. El termociclador se precalienta a 50° C antes de colocar en él los tubos de RT - PCR.

La RT - PCR se realiza con los siguientes ciclos térmicos:

- 30 - 30 minutos a 50° C
- 15 minutos a 94° C
- 45 ciclos (20 segundos a 94° C, 20 segundos a 55° C, 30 segundos a 72° C)
- 1 minuto a 72° C
- 30 segundos a 94° C

35 Los productos amplificados son almacenados a 4° C hasta su posterior utilización.

**Detección del SARS - CoV**

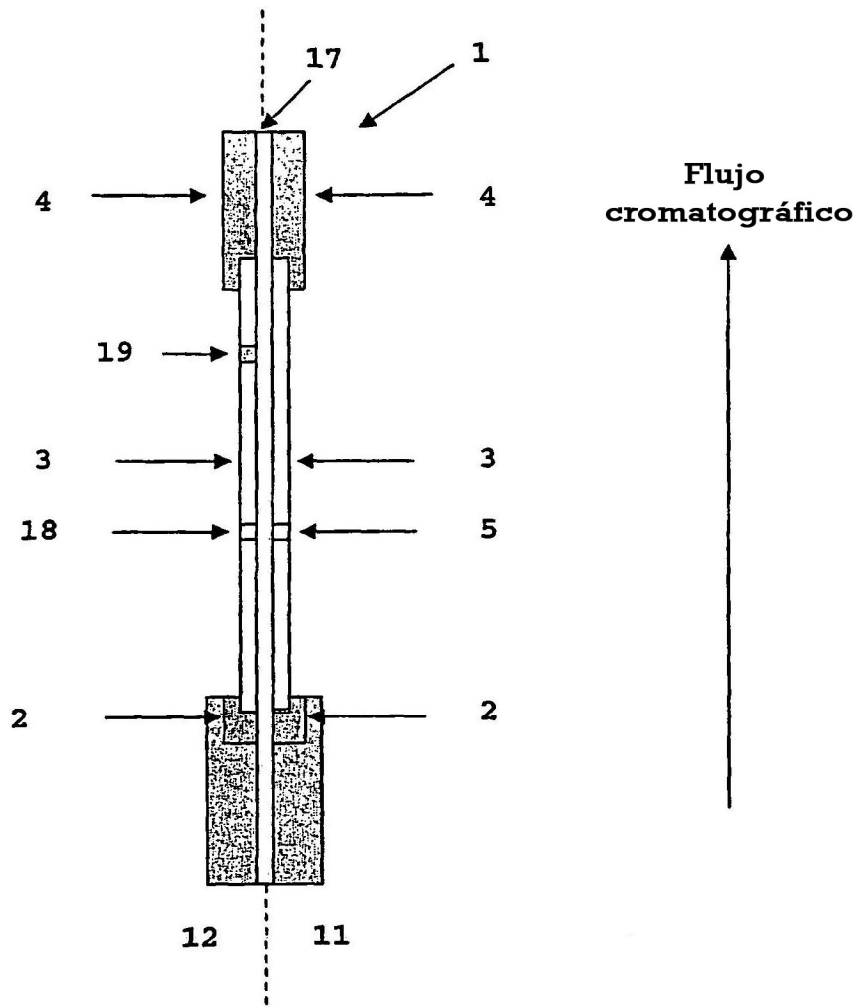
La detección se realiza igual que la detección de los productos amplificados del *T. gondii*.

Los laminados de nitrocelulosa de doble cara también son útiles para propósitos inmunocromatográficos, para la detección de numerosos analitos diferentes en el denominado modo de detección multiplex.

40

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo cromatográfico (1) en forma de lámina que está fabricado de laminados de nitrocelulosa de doble cara que comprende:
- una región (2) de aplicación opcionalmente con una almohadilla de conjugado,
  - 5 - una región (3) de detección posiblemente con una región de control,
  - opcionalmente una región (4) adsorbente y
  - un lado (11) de prueba y un lado (12) de control, en el que dicho lado (11) de prueba contiene reactivos para la detección específica de la secuencia de polinucleótidos diana de interés (7) y en el que dicho lado (12) de control contiene medios cromatográficos de control fabricados de un conjugado (14) de sonda de control para la detección
  - 10 específica de una secuencia (13) de oligonucleótidos de control, en el que dicha región (3) de detección comprende al menos un reactivo (5) de captura que reconoce específicamente un hapteno o péptido (8) conjugado con un oligonucleótido específico para el analito, en el que la región (2) de aplicación comprende al menos
  - un conjugado de sonda etiquetada (6) específica para dicho polinucleótido (7) o un producto amplificado obtenido a partir de la amplificación molecular del analito, estando dicho conjugado de sonda etiquetada (6) impregnado sobre el
  - 15 lado de prueba y que permite la detección de dicho polinucleótido o producto etiquetado generando una señal específica, y
  - un conjugado de sonda etiquetada (14) específica para dicha secuencia (13) de oligonucleótidos de control o un producto amplificado de una amplificación molecular, estando dicho conjugado de sonda (14) etiquetada impregnado sobre el lado de control y que permite la detección de dicha secuencia de oligonucleótidos de control o del producto
  - 20 amplificado generando una señal específica.
2. El dispositivo cromatográfico en forma de lámina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido específico para el analito es idéntico al de los iniciadores usados para la amplificación molecular del analito.
3. El dispositivo cromatográfico en forma de lámina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reactivo (5) es un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento de anticuerpo hipervariable o cualquier
- 25 otra molécula capaz de unirse al hapteno o al péptido (8).
4. El dispositivo cromatográfico en forma de lámina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los conjugados (6, 14) de sonda etiquetada específica son secuencias de oligonucleótidos conjugados con una etiqueta directa (15) y específicos para la secuencia de oligonucleótidos diana de interés (7) o para la secuencia (13) de oligonucleótidos de control.
- 30 5. El dispositivo cromatográfico en forma de lámina de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la etiqueta (15) se selecciona entre el grupo que consiste en coloides metálicos conjugados, partículas de látex conjugadas y micropartículas que tienen un color específico particular.
6. El dispositivo cromatográfico en forma de lámina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se selecciona entre el grupo que consiste en una tira reactiva o un dispositivo de flujo lateral.
- 35 7. El dispositivo cromatográfico en forma de lámina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que está compuesto de substancias poliméricas laminadas sobre un soporte sólido rígido (17), preferiblemente un soporte de polímero en el que dicho lado (12) de control contiene elementos (16) de control de la migración.
8. El dispositivo cromatográfico en forma de lámina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la región (2) de aplicación comprende una membrana fabricada de fibras de vidrio con una almohadilla de conjugado de poliéster, en el que la región (3) de detección comprende una membrana fabricada de nitrocelulosa, nylon o una membrana de poliéter sulfona (predator) sin limitación y en el que la región adsorbente (4) comprende una membrana hecha de celulosa.
- 40 9. El dispositivo cromatográfico en forma de lámina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la región (2) de aplicación y la almohadilla de conjugado están fabricadas del mismo material.
10. Un procedimiento para detectar y/o cuantificar al menos un analito en una muestra biológica detectando la presencia o ausencia de una secuencia (7) de polinucleótidos diana a partir de una amplificación molecular de dicho analito, en el que la secuencia (7) de polinucleótidos se pone en contacto con el dispositivo cromatográfico (1) en forma de lámina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 11.
- 45



**Figura 1.**

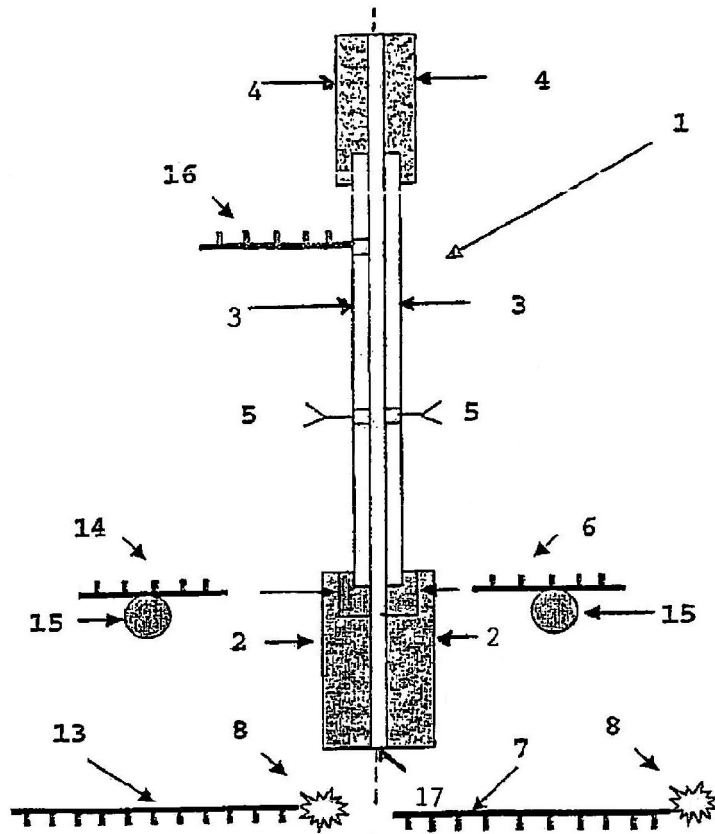


Figure 2a

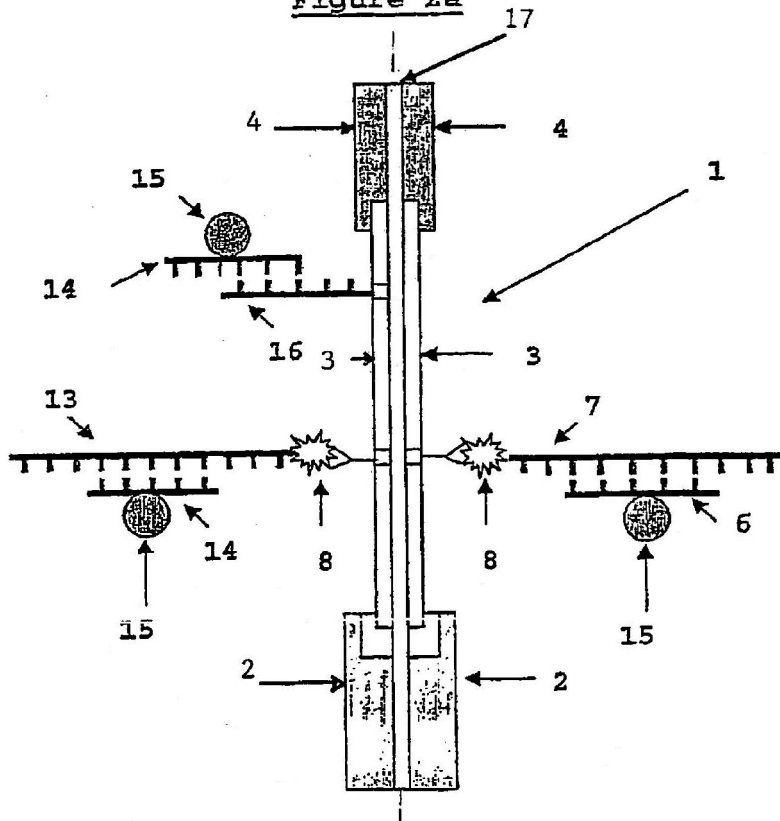


Figure 2b