

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 332**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/558** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2007 E 07732009 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 1996726**

54 Título: **Método y kits de purificación**

30 Prioridad:

**11.03.2006 GB 0604973**

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

**28.08.2015**

73 Titular/es:

**THE SECRETARY OF STATE FOR  
ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS  
(100.0%)**

**c/o FERA Science Limited, Sand Hutton  
York, Yorkshire YO41 1LZ, GB**

72 Inventor/es:

**DANKS, CHRISTOPHER y  
BOONHAM, NEIL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 544 332 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**

Método y kits de purificación.

5 La presente invención se refiere a un nuevo método de purificación, que puede utilizarse en una gran diversidad de ensayos, así como a reactivos y kits útiles en dicho método.

10 Una gran diversidad de métodos de ensayo se utiliza en diagnósticos o detección. La detección de analitos tales como proteínas sobre una diversidad de soportes sólidos es bien conocida en la técnica. Muchos de tales ensayos se encuentran en forma de ensayos de "varilla de nivel" que están basados en el flujo lateral de una muestra líquida que contiene el analito a lo largo de una membrana, donde los mismos encuentran etiquetas, parejas de fijación etiquetadas y/o parejas de fijación inmovilizadas, en una secuencia por la cual se revela sobre la membrana una señal detectable visible. Tales métodos son ventajosos en el sentido de que proporcionan resultados rápidos, y pueden ser utilizados por operadores inexpertos prácticamente en cualquier lugar.

15 Por ejemplo, los mismos pueden ser utilizados en agricultura para detectar plagas o patógenos particulares en plantas de cosecha, tales como antígenos fúngicos o infecciones virales.

20 En ciertas situaciones, un resultado simple positivo o negativo, indicativo de la presencia o ausencia de analito, es todo lo que se necesita. Por ejemplo, tales ensayos se utilizan comúnmente en tests de gestación, y la mera presencia de una hormona específica, tal como HCG, es indicativa de que el sujeto está gestante.

25 Sin embargo, en muchas circunstancias, un test de este tipo puede proporcionar sólo una diagnosis preliminar de un posible problema o condición. En el caso de muchos microorganismos, por ejemplo, la presencia de una proteína particular puede ser indicativa de la presencia de un tipo de organismo particular, tal como la clase general bacteriana, fúngica o viral que está presente, pero la cepa precisa del organismo puede no ser detectable de esta manera. Dado que la cepa precisa es frecuentemente crítica en la determinación del nivel exacto de riesgo de cualquier escenario particular, se requieren investigaciones adicionales. Por ejemplo, pueden existir muchas cepas de una bacteria particular tal como *E. Coli* o virus tales como virus de la gripe, pero sólo cepas particulares tales como *E. coli* 0157 o la cepa H5N1 de la gripe aviar que presentan un riesgo importante para la salud. La diagnosis precisa de estas cepas puede ser difícil, dado que los anticuerpos utilizados en las técnicas de diagnóstico pueden interaccionar o reaccionar cruzadamente con proteínas de diversas cepas.

35 Métodos alternativos de detección o diagnosis actúan al nivel del ácido nucleico. En estos métodos, secuencias particulares de ácido nucleico, tales como secuencias de DNA o RNA se detectan en las muestras, y esto indica la presencia de organismos particulares. Estas técnicas son muy sensibles, y por selección de ácidos nucleicos diana característicos adecuados, pueden detectarse cepas precisas o incluso formas alélicas o genómicas precisas de genes particulares, que pueden ser características de enfermedad genómica o predisposición para ciertos estados de enfermedad.

40 Las técnicas de amplificación tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) significan que estas técnicas pueden emplearse incluso cuando la cantidad de ácido nucleico presente o probablemente presente en un ensayo es de hecho muy baja.

Así, estas técnicas son una herramienta poderosa en el área de la detección y la diagnosis.

Sin embargo, estas técnicas requieren por lo general ciertos métodos importantes de preparación de la muestra.

5 Frecuentemente es necesario realizar una cantidad importante de purificación o preparación de muestras tales como extractos brutos de tejidos tales como tejido vegetal o animal, o muestras de sangre u orina, a fin de eliminar restos en la muestra que podrían inhibir el método de detección del ácido nucleico, o enmascarar los resultados. Como consecuencia, con frecuencia es difícil realizar estos tests fuera de un ambiente de laboratorio, y por consiguiente las muestras tomadas tienen que ser transportadas para análisis ulterior.

10 El transporte de muestras líquidas que contienen material genético puede ser difícil, requiriendo esterilidad de la recogida de tales muestras, y/o congelación de las muestras. El almacenamiento temporal de muestras que contienen material genético tales como sangre, secadas sobre ácidos nucleicos en soportes sólidos, y en particular membranas tales como papeles de filtro y análogos es conocido. Sin embargo, se percibe generalmente que pueden presentarse problemas con la estabilidad de dicho material almacenado, habiéndose sugerido métodos para mejorar esto, que implican impregnación del soporte sólido con diversos reactivos químicos, que incluyen bases débiles y agentes quelantes (véase por ejemplo la patente U.S. No. 5.756.126).

15 Tarjetas de almacenamiento que pretenden realizar ciertos pasos preliminares de preparación de la muestra, tales como lisis celular y desnaturalización de proteínas, así como añadir potencialmente reactivos tales como cebadores de PCR que pueden utilizarse en análisis subsiguiente, se describen también en la patente US No. 5.756.126, y están disponibles de Whatman como tarjetas FTA. Éstas llevan reactivos específicos tales como agentes quelantes, bases y detergentes iónicos para facilitar la capacidad de almacenamiento.

20 Se han realizado intentos que permiten la detección de ácidos nucleicos directamente sobre membranas, utilizando dispositivos y sistemas complejos que emplean agentes de fijación para ácidos nucleicos específicos, haptenos y/o restos etiquetados que generan una señal, de modo análogo a lo encontrado con un analito proteínico convencional (véase por ejemplo WO 00/29.112 y Dinerva et al., J. of Clin. Microbiol. (2005) p 4015-4021). En estos casos, es generalmente necesaria una amplificación, utilizando por ejemplo una reacción en cadena de polimerasa a fin de obtener cantidad suficiente del DNA diana presente en la muestra para proporcionar una señal detectable.

25 Los solicitantes han encontrado, sin embargo, que un dispositivo de flujo lateral convencional de líquido, como el utilizado por ejemplo en un inmunoensayo de tipo varilla de nivel puede proporcionar un medio excelente de purificación y almacenamiento de ácidos nucleicos, listo para análisis subsiguiente.

30 Conforme a la presente invención, se proporciona un método para separación de ácido nucleico de una muestra líquida, comprendiendo dicho método los pasos de aplicar una muestra líquida que contiene o se sospecha que contiene dicho ácido nucleico a una sección de recepción de la muestra de una de membrana absorbente que no lleva ningún agente de fijación específico para ácidos nucleicos, hacer que dicha muestra líquida fluya a lo largo de la membrana absorbente, a fin de que el ácido nucleico se distribuye en toda la longitud de la membrana y, después de ello, detectar el ácido nucleico o recuperar el ácido nucleico de una región de dicha membrana que está separada de la sección de recepción de la muestra.

Los solicitantes han encontrado que, cuando se deja fluir a lo largo de una membrana absorbente, incluso en el tipo de condiciones utilizadas en un dispositivo de flujo de líquido, los ácidos nucleicos se fijan a las membranas, en particular las membranas de celulosa o nitrocelulosa, utilizadas en estos dispositivos. Parece ser que al dejar que una muestra líquida fluya a lo largo de una membrana absorbente, cualesquiera ácidos nucleicos presentes quedan retenidos preferentemente en la membrana y así pueden separarse de otros componentes en la muestra. En estas circunstancias, aquéllos se distribuyen en toda la longitud de la membrana, en particular a lo largo de sustancialmente la totalidad y convenientemente toda la longitud de la membrana, en una forma en la que los mismos son estables. No hay necesidad alguna de proporcionar agentes de fijación específicos en la membrana para asegurar que los ácidos nucleicos quedan retenidos o concentrados en un área particular o prevenir la elución completa de la membrana. Esto hace que el dispositivo sea más sencillo y más económico de producir. La presencia de ácidos nucleicos en la membrana puede detectarse utilizando cualquiera de los métodos de detección convencionales.

La presencia de ácido nucleico en la membrana puede detectarse subsiguientemente o el ácido nucleico puede recuperarse subsiguientemente de dicha membrana, sea antes o después que las membranas se han dejado secar.

Como resultado, estas membranas proporcionan medios de purificación fácilmente disponibles y fáciles de utilizar, que pueden emplearse en una gran diversidad de aplicaciones. Campos en los que puede utilizarse esto incluyen ensayos de alimentos y de agricultura, diagnósticos (con inclusión de diagnósticos humanos y veterinarios), monitorización ambiental (con inclusión de monitorización de agua y suelos), ensayos forenses, de materiales transgénicos, medicina de transfusión, cribado de plásmidos, descubrimiento de fármacos, ensayos genómicos, identificación o clasificación de plantas o animales, farmacogenética, análisis STR e investigación de biología molecular.

Por ejemplo, el método de la invención puede llevarse a cabo como un paso preliminar para cualquier forma de análisis genético, tal como tipificación de SNP, huella genética del DNA o secuenciación de ácido nucleico, así como en detección de ácidos nucleicos específicos, lo que puede ser útil en el diagnóstico de enfermedades o la detección de patógenos.

Una vez separado en la membrana, el ácido nucleico puede someterse a análisis ulterior in situ o, en caso necesario, el ácido nucleico puede eluirse de o separarse de cualquier otro modo de la membrana utilizando un tampón adecuado, y el análisis puede realizarse sobre el eluato o extracto.

La membrana puede utilizarse en lugar de una columna de purificación convencional, y representa una opción mucho más económica y fácil de utilizar.

Los solicitantes han encontrado también que los ácidos nucleicos se mantienen in situ y estables sobre las membranas, que se han dejado secar, durante periodos de tiempo prolongados, que incluyen muchos años. Como resultado, las muestras pueden almacenarse o incluso archivararse durante periodos de tiempo prolongados antes del análisis.

La membrana es convenientemente un elemento de un dispositivo convencional de flujo de líquido.

5 Como se utiliza en esta memoria, el término “dispositivo de flujo de líquido” se refiere a un dispositivo que comprende una membrana porosa o absorbente, a través de la cual puede pasar una muestra líquida y reactiva que incluyen, en algunos casos, reactivos etiquetados. Éstos pueden incluir los bien conocidos dispositivos de flujo lateral (LFDs).

10 El ácido nucleico, que se recupera o se detecta puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico que es característico de un organismo particular, tal como un organismo patógeno, por ejemplo un virus, hongo o bacteria, o más convenientemente, un ácido nucleico que es característico de una cepa o especie patógena particular de un organismo de este tipo.

15 Alternativamente, para propósitos de diagnóstico, aquél puede comprender una secuencia de ácido nucleico específica que es característica de una condición de enfermedad genética en una planta o animal, con inclusión de humanos, o de una predisposición para una enfermedad o condición genética, en cuyo caso puede ser necesario detectar la presencia de uno o más polimorfismo o variaciones en la secuencia.

20 Como se ha expuesto anteriormente, el aislamiento de ácidos nucleicos para propósitos analíticos es muy utilizado en una amplia gama de campos, y la presente invención puede utilizarse en cualquiera de estos.

25 Secuencias múltiples de ácido nucleico pueden detectarse en o recuperarse de la membrana. Éstas pueden ser de la misma o diferentes fuentes, dependiendo del propósito del test. Por ejemplo, si se trata de identificar la presencia de un organismo infeccioso en una muestra, podría ser deseable detectar no sólo un ácido nucleico, que es característico del organismo, sino también un ácido nucleico que es característico del organismo hospedador a fin de confirmar la veracidad de la muestra.

30 Esto puede hacerse por ejemplo por detección de más de un ácido nucleico en una muestra particular de la membrana (utilizando por ejemplo una PCR multiplex) o por sometimiento de diferentes muestras de la membrana a diferentes reacciones de detección.

35 Como se utiliza en esta memoria, el término “membrana” se refiere a matrices sólidas que son generalmente de naturaleza plana y porosas. Matrices o membranas adecuadas pueden comprender materiales de base celulósica tales como celulosa, nitrocelulosa, o carboximetilcelulosa, polímeros hidrófilos que incluyen polímeros hidrófilos sintéticos tales como poliésteres, poliamidas, polímeros de carbohidratos, polímeros hidrófobos tales como polímeros halogenados tales como politetrafluoretileno, fibra de vidrio o cerámicas porosas.

40 Membranas particularmente adecuadas incluyen membranas celulósicas y en particular membranas de nitrocelulosa estar laminadas, tales como las disponibles de Millipore. Éstas pueden estar soportadas sobre un material de respaldo tal como una membrana con respaldo de plástico tal como un poliéster (Mylar®) o membrana de celulosa con respaldo de PET. El tamaño de poro de la membrana puede variar ampliamente. Los solicitantes han encontrado que el tamaño de poro no parece ser crítico para la retención u otra circunstancia de los ácidos nucleicos. Están disponibles membranas que tienen tasas de flujo lateral a través de una longitud de 4 cm de

membrana comprendidas en el intervalo de 35-240 s, convenientemente de 65-180 s, y son eficaces en el método de la invención. Esto está correlacionado generalmente con un tamaño de poro y/o formulación del material de la membrana tal como nitrocelulosa, como sería comprendido en la técnica.

5 Los dispositivos pueden adoptar diversas formas, pero en general comprenden una sección de recepción de la muestra, que es una sección de la membrana propiamente dicha o una almohadilla absorbente, que está en contacto líquido con la membrana. Las membranas propiamente dichas se encuentran convenientemente en la forma de una tira alargada, a lo largo de la cual puede desplazarse el líquido depositado en la sección de recepción de la muestra. Una almohadilla absorbente puede estar localizada en un extremo de la membrana alejado de la  
10 sección de recepción de la muestra a fin de absorber el exceso de muestra y también para aspirar eficazmente la muestra líquida a lo largo de la membrana.

Convenientemente, la membrana está acomodada al menos en un alojamiento compacto, tal como un alojamiento de plástico, que puede estar provisto de una o más aberturas o ventanas para entrada de la muestra y/o para lectura  
15 de los resultados cuando se utilizan éstos en un procedimiento convencional de inmunoensayo. Alternativamente, la sección de recepción de la muestras puede estar situada fuera del alojamiento.

No obstante, en algunos casos pueden preferirse estructuras de varilla de nivel sin alojamiento, en particular si están laminadas para soporte y protección, particularmente para uso en laboratorio.

20 En una realización, el método puede utilizarse en un ensayo para detectar la presencia de un ácido nucleico específico en una muestra líquida.

La muestra aplicada es convenientemente cualquier muestra líquida que contiene o se sospecha que contiene secuencias de ácido nucleico. Así, las muestras comprenden un líquido que tiene, disuelto, suspendido, mezclado o contenido de algún otro modo en él, ácido nucleico (con inclusión de DNA y/o RNA), o células, componentes de células o extractos de células que contienen DNA y/o RNA.

Las muestras de esta naturaleza pueden proceder de una gran diversidad de fuentes. Esto incluye por ejemplo, líquidos corporales fisiológicos, patológicos o líquidos clínicos tales como secreciones, excreciones, exudados y transudados de humanos o animales, así como suspensiones de células tales como sangre, suero, linfa, fluido sinovial, semen, saliva (que contiene en particular células bucales), raspados de piel y células de raíz capilar recogidas de animales con inclusión de humanos. Muestras adicionales pueden incluir líquidos fisiológicos o patológicos o suspensiones de células de plantas, productos líquidos tales como extractos o suspensiones de  
35 bacterias, hongos, plásmidos o virus, etc., y productos líquidos, extractos o suspensiones de parásitos tales como helmintos, protozoos, espiroquetas. Pueden formarse también muestras líquidas obtenidas por formación de extractos de tejido, por ejemplo tejidos vegetales o animales. No obstante, las muestras pueden comprender también medios procedentes de síntesis de DNA o RNA o mezclas de DNA o RNA sintetizados química o bioquímicamente.

40 En particular, las muestras incluyen muestras fisiológicas o clínicas tales como sangre, orina, leche o saliva, así como suero, o pueden comprender extractos de tejido, por ejemplo extractos de tejidos vegetales tales como

extractos de hoja, tallo, corteza o tubérculo, o tejido animal (con inclusión de sangre, hueso, hígado, riñón, etc.) o extractos fecales.

5 Preferiblemente, la muestra comprende un extracto de tejido, de un organismo tal como una planta o un animal, que puede estar infectado por ejemplo por un microorganismo y en particular un microorganismo patógeno, o que precisan ser sometidas a análisis genético para tipificación u otros propósitos. Los extractos se preparan convenientemente por extracción de la muestra en una solución tampón adecuada. Los solicitantes han encontrado que los tampones utilizados para extracción de muestras de proteínas para uso en inmunoensayos extraerán también los ácidos nucleicos, y por consiguiente éstos pueden utilizarse en el presente proceso. La solución tampón  
10 precisa utilizada en cualquier caso particular dependerá de la naturaleza de la muestra que se ensaya. Sin embargo, para la extracción de ácidos nucleicos de muestras vegetales o animales, una solución tampón adecuada puede comprender un tampón que está disponible fácilmente, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina tamponada con Tris (TBS).

15 Los tampones pueden comprender convenientemente conservantes tales como azida de sodio, formalina o tiomersal. La cantidad de conservante añadida en cada caso dependerá del conservante específico utilizado, así como del tipo y volumen de tampón implicado, pero para la azida de sodio por ejemplo, la misma puede añadirse convenientemente en una cantidad de 0,2 a 1,5%, p/p, por ejemplo aproximadamente 0,5% p/p.

20 Convenientemente, la muestra de tejido a ensayar se mezcla íntimamente con el tampón de extracción, opcionalmente con medios mecánicos de fragmentación. Por ejemplo, se han preparado muestras de tejido y particularmente muestras de tejido vegetal para procedimientos de inmunoensayo poniendo éstas en pequeñas botellas que comprenden tampón de extracción y cojinetes a bolas, y sacudiendo enérgicamente las mismas a fin de que los cojinetes a bolas impacten en la muestra y ayuden a la rotura de la estructura celular.

25 Las muestras de tejidos u otros tipos pueden manipularse de modo diferente, pero el medio preciso de extracción de los ácidos nucleicos en extractos podría ser determinado por una persona experta en la técnica.

30 Una vez que la muestra se aplica a la membrana en la zona de recepción de la muestra, se deja que la misma se desplace a lo largo de la membrana como resultado del flujo absorbente. Dependiendo de la naturaleza de la muestra y la membrana, este procedimiento puede ocurrir rápidamente con experiencia e implicación mínimas requeridas por parte del operador.

35 Después de ello, se toma la membrana, o más adecuadamente una porción de la membrana, por ejemplo una pequeña tira o punzón extraído de la membrana, por ejemplo en un ambiente de laboratorio, y se utiliza para análisis ulterior. Éste puede comprender análisis genético tal como tipificación de SNP o determinación de la huella genética del DNA, así como un ensayo de detección de ácido nucleico, como se ha expuesto anteriormente.

40 Se toma la porción de una región que está separada de la sección de recepción de la muestra. Esto puede ser particularmente importante en casos en que la muestra contiene por ejemplo proteínas o moléculas particularmente grandes que no se eluyen bien a lo largo de la membrana y que por tanto pueden retenerse en la sección de recepción de la muestra e inhibir cualquier método de detección subsiguiente tal como la PCR. Muestras particulares

que pueden verse afectadas de esta manera incluyen extractos de plantas, en donde moléculas grandes tales como la clorofila tienden a quedar retenidas sobre la membrana en la región de la sección de recepción de la muestra en el dispositivo.

- 5 Si se desea, la membrana puede estar marcada para indicar un tamaño y posición adecuados de la porción. Un sitio particular para extracción de una muestra de membrana puede ser en la región de las zonas de detección y control en un LFD de inmunoensayo convencional. Líneas de control, que se revelan en el curso del ensayo, en particular por técnicas de inmunoensayo, en las cuales pueden utilizarse etiquetas para delimitar una porción de extracción de la muestra. Esto proporciona una ventaja adicional de confirmación de que el ensayo ha progresado
- 10 adecuadamente. El tamaño de la porción de la membrana utilizada en el test puede ser particularmente importante si se requiere cuantificación del ácido nucleico.

La detención análisis del ácido nucleico puede efectuarse utilizando cualquier técnica convencional. En caso necesario o deseado, los ácidos nucleicos almacenados o retenidos en la membrana pueden separarse

15 primeramente por lavado de la membrana utilizando agua o, si es necesario, separarse por elución utilizando tampón de elución convencional, y los lavados o el eluato pueden someterse a análisis. El lavado durante 10 min a temperaturas que oscilan desde la temperatura ambiente a temperatura elevada, por ejemplo hasta 100°C dará generalmente como resultado la liberación del ácido nucleico de la membrana.

- 20 Preferiblemente, sin embargo, el análisis se conduce directamente sobre una porción de la membrana.

Si se conoce previamente, la forma que tendrá el análisis del ácido nucleico, puede ser conveniente incorporar en la membrana uno o más reactivos útiles en dicho análisis, por ejemplo en forma seca, antes de su utilización. Estos reactivos pueden estar posicionados a lo largo de la longitud de la membrana, o bien, si son móviles a través de la

25 membrana pero quedan retenidos al menos en cierta proporción en la misma, aquéllos pueden localizarse por difusión en una sección de recepción de la muestra o almohadilla en la membrana, de tal modo que puedan ser transportados con la muestra líquida a todo lo largo de la longitud de la membrana.

Por ejemplo, a fin de detectar la presencia de un ácido nucleico específico en la membrana, la membrana o porción

30 de la membrana se sumerge en una mezcla PCR. Mezclas PCR son bien conocidas en la técnica. Las mismas contienen convenientemente reactivos tales como nucleótidos, polimerasa y un conjunto de cebadores PCR que están diseñados para amplificar una secuencia de ácido nucleico específica, que puede ser característica de un organismo particular. Las reacciones PCR pueden comprender además tampones, sales de magnesio, etc.

35 En caso deseado, uno o más de los reactivos necesarios para realización de la PCR puede(n) estar “precargado(s)” en la membrana, sea en toda su longitud o cargados difusiblemente en la muestra, sección de recepción o almohadilla en la membrana. En el último caso, agentes de “captura” adecuados tales como anticuerpos o fragmentos de fijación de anticuerpos, que son específicos para uno o más de estos reactivos, pueden estar

40 inmovilizados en una porción de la membrana que está destinada a análisis ulterior, a fin de concentrar estos reactivos en dicha porción, listos para su uso ulterior. Esto puede ser particularmente deseable y conveniente en el caso en que el reactivo es un polipéptido o una proteína tal como una enzima polimerasa.

Reactivos particularmente adecuados para inclusión de esta manera incluyen cualesquiera cebadores o sondas que pueden ser necesarios para diseñar un ácido nucleico específico. Por incorporación de reactivos específicos de este tipo en la membrana, sería posible utilizar para el análisis mezclas o restos de amplificación pre- mezclados, tales como cuentas listas para PCR.

5 Una vez que se ha formado una mezcla PCR en presencia de ácidos nucleicos sobre la membrana, la misma se somete luego a una pluralidad de ciclos térmicos, a fin de causar la desnaturalización de los ácidos nucleicos presentes en la muestra, cebadores para reasociación a cualquier secuencia diana presente en la mezcla de reacción, y se extiende luego con la polimerasa, durante cada ciclo.

10 En una realización particular, la reacción PCR se lleva a cabo de una manera cuantitativa. Para este propósito, reactivos etiquetados, por ejemplo sondas etiquetadas y/o agentes de fijación de DNA tales como tintes de intercalación pueden incluirse en la reacción PCR. Un tipo de ensayo cuantitativo particular es el ensayo TAQMAN™, en el cual una sonda etiquetada con dos restos fluorescentes que interaccionan uno con otro por FET o FRET. En el curso de la PCR, la sonda se hibrida a la secuencia amplificada, después de lo cual la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa digiere la sonda, separando con ello los restos fluorescentes que emiten fluorescencia diferente una vez que aumenta la distancia física entre los restos y con ello deja de ocurrir la interacción. El cambio de fluorescencia puede ser detectado fácilmente y con ello puede monitorizarse el aumento en la cantidad de secuencia de ácido nucleico amplificada. Por monitorización del cambio a lo largo de los ciclos de amplificación, se puede determinar la cantidad de ácido nucleico en la muestra.

20 Con objeto de relacionar la cantidad de ácido nucleico presente en la membrana con la cantidad contenida en la muestra, puede ser necesario o deseable asegurarse de que se aplica inicialmente a la membrana una cantidad de muestra precisa o medida, y que el tamaño de cualquier porción de la membrana utilizada en el análisis se controla cuidadosamente.

Están disponibles otros métodos PCR cuantitativos, por ejemplo como se describe en la Patente Europea No.1.049.802B, así como por el uso de sondas Scorpion™ (<http://www.dxsgenotyping.com/technology.htm>) y Loop-Mediated Isothermal Amplification Method (LAMP) (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html>).

30 En una realización particular, la invención proporciona un ensayo para detección de la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método los pasos de hacer que una muestra líquida que se sospecha contiene dicho ácido nucleico fluya a lo largo de la membrana, por ejemplo de un dispositivo de flujo de líquido, y detectar la presencia de dicho ácido nucleico diana sobre dicha membrana.

35 Parece ser que por la "extensión" efectiva del ácido nucleico sobre un área amplia, los ácidos nucleicos llegan a separarse suficientemente de otros componentes en la muestra para hacer posible que los mismos se detecten utilizando un método de detección de ácido nucleico convencional tal como PCR, mucho más rápida y fácilmente que sucedería, por ejemplo, si la muestra propiamente dicha tuviera que analizarse de este modo. En efecto, parece ser que los ácidos nucleicos quedan retenidos en la estructura de la membrana, y esto tiene un efecto de purificación.

40

Como se ha sugerido anteriormente, esto representa un método muy eficaz y eficiente en costes para realizar un paso de purificación simple en cualquier análisis, pero en particular para un análisis que implica amplificación de ácido nucleico tal como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) que puede conducirse en presencia de material de membrana sin inhibición importante.

5 Una ventaja adicional del método arriba descrito es que la etapa de purificación podría realizarse “in-situ”, por ejemplo en situaciones de campo, o utilizando kits que pueden utilizarse en casa o en consultorios de cirugía, con inclusión de consultorios médicos y veterinarios. Únicamente es necesario enviar al laboratorio para análisis la membrana o el dispositivo que la contiene y no la muestra líquida, eliminando así virtualmente el riesgo de  
10 contaminación del equipo y personal de laboratorio.

No obstante, pueden utilizarse también dispositivos portátiles que son capaces de realizar análisis de ácido nucleico in situ para permitir que el proceso analítico completo se realice sin requerir transporte de las muestras. Tales dispositivos están haciéndose disponibles pero, hasta la fecha, ha sido un problema el que la necesidad de  
15 procedimientos complejos de preparación de la muestra limita su utilidad y transportabilidad.

Si se desea, la membrana, o casetes, cartuchos o similares que están adaptados para retener membranas y que pueden ser desechables, pueden incluirse en tales dispositivos. Esto puede permitir que se efectúe una purificación rápida y fácil en una situación de “campo”, antes del análisis in situ.

20 El ácido nucleico detectado como se ha descrito arriba puede ser cualquier ácido nucleico diana deseado. En una realización, sin embargo, se requerirá generalmente detectar ácidos nucleicos que son característicos de organismos patógenos particulares de plantas o animales tales como bacterias, virus u hongos, y en particular aquéllos que permiten la tipificación o serotipificación de la una cepa de dichos organismos.

25 No obstante, como se ha expuesto anteriormente, el método puede utilizarse para purificar ácidos nucleicos para cualquier propósito, con inclusión de secuenciación o análisis genéticos, que incluyen genotipificación o análisis de SNP. Muchas de estas técnicas utilizan reacciones de amplificación tales como PCR, y el método arriba descrito puede utilizarse en asociación con cualquiera de éstos.

30 En una realización particularmente preferida, la membrana que se utiliza en los métodos o ensayos arriba descritos es un elemento de un dispositivo de flujo de líquido que está dispuesto para realizar un ensayo para un analito diferente, por ejemplo inmunoensayo para un analito poliláctico particular, por ejemplo un analito de proteína o péptido, pero otros analitos tales como productos químicos, por ejemplo pesticidas o residuos de pesticida pueden  
35 comprender el analito diferente en este caso. El analito diferente puede ser uno que es indicativo también del patógeno o condición particular para el que se está realizando el ensayo.

De este modo, el método de inmunoensayo puede actuar como un paso preliminar en el procedimiento de ensayo. Si el resultado del paso de inmunoensayo es negativo, puede no ser necesario continuar con el paso más complejo  
40 de detección del ácido nucleico. En cambio, si el resultado es positivo, indicando por ejemplo la presencia de un tipo de organismo particular, el segundo paso, de detección de ácido nucleico que es característico de dicho organismo,

proporcionará confirmación del resultado, y adicionalmente, dependiendo de la naturaleza de la secuencia de ácido nucleico diana, puede proporcionar clarificación ulterior de la naturaleza, especie o cepa del organismo.

5 Sin embargo, no es necesario que el analito diferente y el o cada uno de los ácidos nucleicos proceda de la misma fuente u organismo. Por ejemplo, puede ser deseable que uno del analito o ácido nucleico sea característico de un organismo infeccioso particular, y el otro sea característico de un hospedador de dicho organismo. En particular, si el analito es característico de un organismo infeccioso, puede ser útil detectar un ácido nucleico que se encuentra en un gen del hospedador que impacta en la sensibilidad o resistencia del hospedador a dicho organismo. Por ejemplo, si el analito diferente es un pesticida o residuo de pesticida por ejemplo, puede ser útil detectar la presencia de un gen en la planta hospedadora que impacta en la resistencia de la planta hospedadora al pesticida.

10 Analitos ulteriores pueden incluir por ejemplo anticuerpos para un patógeno particular y ser generados así por el organismo hospedador. Sin embargo, análisis de ácidos nucleicos que buscan ácidos nucleicos que son característicos del organismo patógeno propio antedicho, o de una cepa de vacuna o vacuna sub-unitaria atenuada, que incluye por ejemplo una secuencia marcadora, que es detectada más tarde, pueden proporcionar una indicación de si un animal ha estado expuesto o no a la enfermedad o vacunado. El método de la invención permite la realización rápida y fácilmente de dicho análisis combinado, y puede conducir a información acerca del estatus de vacunación de un animal. Esto puede ser particularmente importante en el caso de enfermedades tales como TB o rabia, en las que se requiere el seguimiento de los animales vacunados.

20 Ejemplos de patógenos de plantas que pueden ser ensayados respecto a la utilización del método de la invención, por ejemplo, incluyen *Phytophthora* spp., que puede ser una plaga particular de, por ejemplo, las plantas de *Rhododendro* cuyas hojas infecta particularmente aquélla, o PVY, que es un problema particular para las hojas del tabaco, pero se contemplan muchas otras aplicaciones.

25 En el campo de la salud animal, enfermedades veterinarias tales como la glosopeda, la fiebre de los porcinos, y la gripe aviar pueden detectarse adecuadamente utilizando este método. En el caso de problemas de la salud humana, infecciones bacterianas tales como infecciones de *E. coli* o *Salmonella* e infecciones virales tales como la gripe, en particular la gripe aviar, pueden diagnosticarse utilizando el presente método. El método puede estar diseñado para detectar cepas particulares del organismo infeccioso, y esto puede ser muy importante en el caso de que la patogenicidad de diferentes cepas varíe considerablemente, y donde la prognosis o los resultados del tratamiento varíen de acuerdo con ello.

30 Así, en una realización adicional, la invención proporciona un ensayo de dos etapas para detectar la presencia de un analito y un ácido nucleico en una muestra líquida, comprendiendo dicho método los pasos de (i) hacer que una muestra líquida que se sospecha contiene dicho analito y ácido nucleico fluya a lo largo de una membrana de un dispositivo de flujo de líquido capaz de realizar un ensayo para detectar la presencia de dicho analito, en donde la membrana no es portadora de ningún agente de fijación específico para ácidos nucleicos de tal modo que el ácido nucleico se distribuye en toda la longitud de la membrana y, (ii) detectar la presencia en la membrana de dicho ácido nucleico en una región de dicha membrana que está separada de una sección de recepción de la muestra del dispositivo de flujo de líquido.

Cuando se utiliza de esta manera, la membrana del dispositivo de flujo de líquido comprenderá adecuadamente además un agente de fijación etiquetado dispuesto de manera difusible en la misma. El agente de fijación etiquetado está localizado convenientemente en o sobre el área de la zona de recepción de la muestra, de tal modo que el mismo puede transportarse a lo largo de la membrana con la muestra líquida.

5

Por ejemplo, el agente de fijación etiquetado puede aplicarse a una almohadilla absorbente tal como una almohadilla de fibra de vidrio que está situada en la zona de recepción de la muestra, y está en contacto líquido con la membrana. El agente de fijación etiquetado, que comprende por ejemplo un anticuerpo etiquetado en látex, o un análogo de un analito etiquetado en látex se aplica adecuadamente a la almohadilla en una solución tampón que contiene un agente fuertemente bloqueante tal como un agente de bloqueo de proteínas como se expone más adelante. El tampón puede comprender agentes convencionales ulteriores tales como agentes estabilizadores de proteínas, agentes modificadores de la viscosidad o conservantes, ejemplos particulares de los cuales se describen más adelante.

10

15 La almohadilla puede acomodar también uno o más de los reactivos utilizados en el análisis subsiguiente de ácidos nucleicos, tales como cebadores, sondas o polimerasa, como se ha expuesto anteriormente.

Adicionalmente, la membrana estará provista con un segundo agente de fijación específico, inmovilizado sobre ella en una zona de detección que está situada "aguas abajo" de la zona de recepción de la muestra. A medida que la muestra desciende a lo largo de la membrana, cualquier analito presente interaccionará con el agente de fijación etiquetado y/o el segundo agente de fijación específico dando como resultado el desarrollo de una señal (o la ausencia de señal) en la zona de detección que es indicativa de la presencia o ausencia del analito en la muestra.

20

El agente de fijación etiquetado y el segundo agente de fijación inmovilizado se fijarán específicamente al analito o uno a otro de acuerdo con principios de inmunoensayo bien establecidos.

25

Por ejemplo, en un denominado "ensayo sándwich", el agente de fijación etiquetado se fijará específicamente a cualquier analito en la muestra para formar un complejo etiquetado. El segundo agente de fijación se fija también específicamente al analito, de tal manera que el complejo etiquetado se concentra en la zona de detección, dando lugar al desarrollo de una señal visible. Esto se conoce a veces como una "línea de test".

30

En un ensayo competitivo, el agente de fijación de etiquetado es una pareja de fijación para dicho analito o un análogo etiquetado de dicho analito. En este caso, el segundo agente de fijación en la zona de detección se fija específicamente al agente de fijación etiquetado en competición con el analito. Así, por ejemplo, donde el agente de fijación etiquetado es una pareja de fijación etiquetada para dicho analito, un análogo del analito diana se inmoviliza en la zona de detección. A medida que la muestra pasa a lo largo de la zona de detección, cualquier agente de fijación etiquetado libre (es decir, no fijado al analito) se asociará con el agente de fijación inmovilizado y se revelará una señal visible. No obstante, si el analito está presente en la muestra, el mismo se fijará a la pareja de fijación etiquetada antes de alcanzar la zona de detección, y evitará así esta fijación. Por tanto, la ausencia de una señal en la zona de detección es indicativa de la presencia de analito en la muestra.

35

40

Análogamente, cuando el agente de fijación etiquetado es un análogo etiquetado de dicho analito, el segundo agente de fijación inmovilizado es una pareja de fijación para dicho analito y el análogo etiquetado del analito. En este caso, tanto el analito como el análogo etiquetado competirán por los sitios de fijación en la zona de detección. La señal se producirá únicamente como resultado de la fijación del análogo etiquetado, y por tanto, una vez más en este caso, cuanto más analito esté presente, tanto menor será la señal acumulada en la zona de detección.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "análogo del analito" se refiere a un resto que se comporta de manera similar al analito en el contexto del sistema de ensayo. Por tanto, el mismo puede comprender el analito propiamente dicho, o una variante o fragmento del analito, tal como un fragmento epitópico, que interacciona con agentes de fijación específicos utilizados en el ensayo como lo haría el propio analito.

Los solicitantes han encontrado que un dispositivo de flujo de líquido puede no sólo proporcionar un método rápido y fácil para detección de proteínas específicas en una muestra, sino que las condiciones a las cuales se somete la muestra parecen ser un medio útil de capturar ácido nucleico en una forma en la cual el mismo puede ser detectado fácilmente, utilizando por ejemplo un método de amplificación de ácido nucleico tal como la reacción en cadena de polimerasa o "PCR". Por combinación de estas dos técnicas, pueden conseguirse ventajas importantes.

La etiqueta utilizada en el reactivo de fijación etiquetado es preferiblemente una etiqueta visible que puede utilizarse para proporcionar una señal que es legible, sea a simple vista o utilizando un lector de reflectancia, y muy preferiblemente un lector de reflectancia portátil o de sobremesa. Ejemplos de tales etiquetas, etiquetas particuladas tales como látex, oro y sílice.

Pueden emplearse otras etiquetas visibles tales como etiquetas fluorescentes o quimioluminiscentes que pueden detectarse utilizando un fluorímetro o luminómetro respectivamente.

Alternativamente, las etiquetas pueden comprender etiquetas radiactivas, que pueden detectarse utilizando un detector de radiación.

Sin embargo, como se ha expuesto anteriormente, el método de la invención es aplicable en ausencia de cualquier medio de detección visible para el análisis o la detección de ácidos nucleicos.

Las membranas adecuadas para uso en los métodos arriba descritos, tales como las utilizadas en dispositivos de flujo de líquido y en particular membranas de nitrocelulosa son naturalmente hidrófobas, lo cual da lugar al efecto de mecha necesario. No obstante, la hidrofobicidad puede dar lugar a problemas cuando éstas se utilizan en el contexto de un procedimiento convencional de inmunoensayo en ello. Las membranas utilizadas en estos dispositivos se bloquean adecuadamente utilizando agentes de bloqueo convencionales. Los agentes de bloqueo son aquéllos que pueden reducir las interacciones inespecíficas entre cualquier proteína contenida en la muestra y la membrana, o aumentar la velocidad de empapamiento rápido de la muestra. Los mismos se aplican generalmente después de la aplicación de los agentes de fijación inmovilizados y se seleccionan usualmente de tres tipos de agentes que incluyen proteínas, agentes tensioactivos y polímeros sintéticos.

Ejemplos particulares de proteínas que pueden utilizarse como agentes de bloqueo incluyen seroalbúmina bovina (BSA), de componentes de leche en polvo desnatada tales como caseína.

5 Ejemplos de agentes tensioactivos que pueden utilizarse como agentes de bloqueo incluyen agentes tensioactivos no iónicos tales como monolaurato de polioxietilen-sorbitán que se vende bajo el nombre comercial de Tween™ 20 y etoxilatos de octilfenol, por ejemplo como los vendidos por Dow como la serie Triton X™, por ejemplo Triton X-100.

10 Polímeros sintéticos adecuados para uso como reactivos de bloqueo incluyen poli (alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG) y éteres grasos de polioxietileno tales como los derivados de alcoholes láurico, cetílico, estearílico y oleílico, y vendidos bajo el nombre comercial Brij™. Los pesos moleculares de estos polímeros variarán dependiendo de la naturaleza del polímero utilizado, pero generalmente estarán comprendidos en el intervalo de 5-50 kDa, por ejemplo de 8-15 kDa.

15 Está reconocido generalmente que mezclas de dos o más de estos tipos o clases de reactivo de bloqueo pueden emplearse particularmente, por ejemplo una mezcla que comprende un agente tensioactivo y un polímero sintético como se ha indicado arriba.

20 Al parecer, la presencia de ciertos agentes de bloqueo tales como los arriba reseñados puede no dificultar la purificación de los ácidos nucleicos, como ha sido observado por los solicitantes.

Los solicitantes han encontrado que una membrana bloqueada convencionalmente como se ha descrito arriba es adecuada también para fijación inespecífica de ácidos nucleicos. Así, es posible preparar membranas para propósitos de inmunoensayo y conservar las ventajas de la presente invención.

25 Los reactivos de bloqueo se aplican convencionalmente a la membrana en la forma de una solución tampón, que se deja secar antes de su utilización. Los solicitantes han encontrado que tampones adecuados tienen valores de pH en el intervalo de 8 a 9, y con preferencia aproximadamente 8,5. Una gran diversidad de tampones que tienen esta propiedad serían evidentes para una persona experta. Pueden incluirse tampones convencionales, por ejemplo los basados en Tris, fosfatos, hidrogeno-ftalato de potasio, borohidrato de sodio, o bicarbonatos de potasio o sodio que  
30 un ácido o base en caso apropiado, y éstos no parecen reducir la retención del ácido nucleico.

Adicional o alternativamente, los agentes de bloqueo pueden combinarse con los reactivos etiquetados a fin de asegurar que los mismos son difusibles a lo largo de la membrana.

35 La solución tampón utilizada para aplicar el reactivo de bloqueo a la membrana o para aplicar el reactivo etiquetado a la región de suministro de la muestra puede comprender convenientemente además una agente estabilizador de proteínas tal como sacarosa o trehalosa. Éstos pueden modificar también la viscosidad de la solución tampón en un grado suficiente para permitir que el agente de bloqueo llegue a fijarse a la membrana por simple nivel en ella. La cantidad de agente estabilizador incluida en el tampón varía dependiendo de la pureza del tampón y la naturaleza  
40 precisa del agente estabilizador o modificador de la viscosidad.

Una vez más, en caso requerido, puede añadirse un conservante tal como los arriba indicados para el tampón de extracción al tampón que contiene el agente de bloqueo.

5 En caso deseado, el inmunoensayo puede comprender reactivos o componentes adicionales como sería comprendido en la técnica. Por ejemplo, puede tratarse de una pareja de fijación para el agente de fijación etiquetado inmovilizado en una zona de "control", que está localizada convenientemente aguas abajo de la zona de detección. Cualquier agente de fijación etiquetado residual se fijará en esta segunda zona, para producir convenientemente una "línea de control" que es indicativo de flujo satisfactorio del agente de fijación etiquetado. Alternativamente, puede añadirse un reactivo de control específico etiquetado de manera difusible en la membrana, 10 por ejemplo en mezcla con el primer agente de fijación etiquetado, y un agente de fijación específico para el reactivo de control etiquetado inmovilizado en la zona de control para dar lugar a una línea de control, haciendo posible la confirmación de que el inmunoensayo ha transcurrido satisfactoriamente.

15 En caso deseado, el inmunoensayo puede realizarse utilizando un método cuantitativo o semi-cuantitativo como se reseña por ejemplo en WO 2006003394.

Se realizó un estudio a fin de determinar si era posible amplificar una señal utilizando PCR a partir de una línea de test positiva sobre una tira LFD. Se preveía que podría ser útil disponer de esta posibilidad a fin de confirmar un resultado LFD positivo por escisión de la línea de test y realización de la PCR en el laboratorio. Se preveía también 20 que esta técnica podría hacer posible distinguir entre cepas o especies de la diana presentes en la muestra en las cuales el test LFD es incapaz de hacerlo, por ejemplo en el caso de ensayos de *Phytophthora* o gripe aviar.

Los resultados de un estudio particular consignado más adelante demostraron que es posible de hecho confirmar el resultado de la línea de test por PCR. Los resultados demostraron además que es posible realizar un análisis PCR 25 positivo a partir de DNA, tomado de cualquier dominio sobre una tira LFD usada. Se testaron satisfactoriamente dominios situados aguas arriba y aguas abajo de la línea de test.

Adicionalmente, los valores Ct obtenidos por el análisis PCR de DNA procedente de la membrana LFD eran equivalentes a los de análisis utilizando métodos estándar complejos de purificación y/o almacenamiento. Esto 30 sugiere que el tampón de extracción y/o los sistemas de tratamiento de membrana utilizados en el análisis LFD actúan para purificar el DNA y eliminar los contaminantes/inhibidores tan eficazmente como los métodos estándar.

Como se expone adicionalmente más adelante, se utilizaron la tecnología y experiencia existentes para revelar un dispositivo de flujo lateral (LFD) basado en el formato estándar de ensayo sándwich, cuyo principio está basado en 35 la captura de una diana entre una línea inmovilizada de anticuerpo específico de la diana sobre una membrana de nitrocelulosa (línea de test) y un conjugado coloreado látex-anticuerpo (anticuerpo de ratón anti-diana) para presentar una confirmación visible de la presencia de la diana. Se incorporó una línea de anticuerpo anti-ratón en el dispositivo a fin de proporcionar una verificación visual de flujo de látex (línea de control), dando como resultado dos líneas como indicación de detección positiva y una sola línea para un resultado negativo. Se aplicó conjugado de 40 látex sobre una almohadilla de desprendimiento de fibra de vidrio a fin de producir un depósito de partículas estables, y se ensambló junto con la membrana y una almohadilla absorbente en un alojamiento de plástico protector.

La adición de 75 µl (aproximadamente 2 a 3 gotas) de extracto de muestra al pocillo de la muestra liberaba sobre la membrana el conjugado de látex, que comenzó a fluir hacia la almohadilla absorbente. Si estaba presente antígeno diana en el extracto de la muestra, se observaba que la fijación del anticuerpo producía un complejo látex-antígeno, que era capturado a su vez por la línea de test; produciendo así una línea visible de látex depositado. El anticuerpo anti-ratón capturaba cualquier exceso de conjugado de látex, proporcionando una confirmación visible de flujo de látex.

El análisis subsiguiente de muestras de la membrana en toda su longitud por un ensayo PCR en tiempo real demostraba que el ácido nucleico característico de una especie particular del organismo diana (en este caso *Phytophthora ramorum*) era detectable en toda la longitud de la membrana. El análisis ulterior de la membrana revelaba que la misma contenía también DNA COX, que se deriva del hospedador Rhododendron.

Como se ha reseñado arriba, puede considerarse que en general, durante el uso, cualquier elemento de inmunoensayo del test puede conducirse en una situación de campo, y el dispositivo de flujo de líquido, una vez utilizado, proporciona un medio conveniente de transporte de ácidos nucleicos a un ambiente de laboratorio para análisis ulterior. No obstante, pueden prepararse kits para realizar el ensayo.

Así, en un aspecto adicional, la invención proporciona un kit para conducir un ensayo como se describe en esta memoria que comprende una membrana absorbente que no lleva agente de fijación específico alguno para ácidos nucleicos; un reactivo útil en una reacción de amplificación de ácido nucleico presente en la membrana antes de la aplicación de una muestra, y en el cual la membrana absorbente es un elemento de un dispositivo de flujo de líquido, en el que el dispositivo de flujo de líquido está dispuesto para realizar un inmunoensayo a fin de detectar un polipéptido.

Reactivos adecuados utilizados en la detección de ácidos nucleicos incluyen uno o más cebadores adecuados para amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana, pero otros reactivos pueden incluir sondas en sondas particulares etiquetadas fluorescentemente tales como las utilizadas en el ensayo TAQMAN™, que serán específicas para el ácido nucleico diana, así como enzimas tales como DNA-polimerasa, tampones, sales, etc.

Convenientemente, el dispositivo de flujo de líquido está dispuesto para conducir un inmunoensayo a fin de detectar un analito, en particular un analito polipeptídico que se deriva de la misma especie que el ácido nucleico diana. El mismo puede presentar un formato de ensayo sándwich o competitivo como se ha expuesto anteriormente.

La invención se describirá particularmente a continuación a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos diagramáticos que se adjuntan, en los cuales:

La Figura 1 ilustra esquemáticamente un dispositivo de flujo de líquido que puede utilizarse en el método de la invención;

la Figura 2 ilustra un régimen de toma de muestras de membrana que puede utilizarse en el método de la invención;

la Figura 3 ilustra los resultados de una reacción PCR efectuada en una realización de la invención;

5 la Figura 4 es un gráfico que muestra valores Ct para una amplificación Taqman™ de una serie de dilución de DNA de *P. ramorum* extraído en comparación con el transportado sobre una membrana de un LFD a lo largo de la cual se ha pasado una muestra de un extracto bruto de una especie de rododendro infectada con *Phytophthora ramorum*;

10 la Figura 5 es un gráfico que muestra los valores Ct para el mismo ensayo que el utilizado en relación con la Figura 4, pero sobre el extracto bruto propiamente dicho, inmediatamente después de la preparación realizada (extracto bruto), así como sobre una membrana de un LFD tratado con el extracto bruto inmediatamente después de la preparación (dispositivo);

15 la Figura 6 es un gráfico que muestra una comparación de valores Ct similar a la que se muestra en la Figura 6 realizada sobre el mismo extracto bruto y la misma membrana, pero después de almacenamiento a la temperatura ambiente durante 7 meses;

la Figura 7 es una gráfica de amplificación Taqman™ de los resultados representados en la Figura 6;

20 la Figura 8 es una gráfica de amplificación para la detección Taqman™ de rRNA 18S en suero de ratón normal; control negativo = agua;

la Figura 9 muestra una gráfica de amplificación para la detección Taqman™ de PVY en tabaco inoculado;

la Figura 10 muestra una gráfica de amplificación para detección Taqman™ de PVX en tabaco inoculado;

25 la Figura 11 muestra un gel obtenido después de una reacción PCR convencional para *P. ramorum*.

### **Ejemplo 1**

#### **Detección de *Phytophthora ramorum***

30 Una muestra de hojas de *Rhododendron* sp. infectado con *Phytophthora ramorum* (1-2 cm<sup>2</sup>) se cortó en pequeños fragmentos utilizando una cuchilla de escalpelo, y se puso en una botella de extracción LFD, de un kit LFD obtenido de Pocket Diagnostics™ (CSL, York, Reino Unido) que contenía tampón de extracción.

35 La botella se sacudió durante aproximadamente 2 min y se transfirieron luego 2 gotas de la muestra al pocillo de muestra de un LFD de *Phytophthora* spp. contenido en el kit. En este caso, el LFD comprende un formato de inmunoensayo sándwich convencional como se ilustra en la Figura 1.

40 Una vez que se hubo absorbido la muestra, la membrana se retiró del alojamiento de plástico y se cortaron 8 tiras de 1-2 m de anchura en toda la longitud de la membrana (Fig. 2). Cada tira se cortó por la mitad, y cada mitad de la tira se puso en un pocillo separado de una placa de 96 pocillos que contenía 25 µl de mezcla madre para PCR multiplex en tiempo real (Taqman) para *P. ramorum* y COX (1 x tampón PCR (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, 0,001% de

gelatina), 0,025 U/μL Hot Taq, 0,2 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 5,5 mM, 1 x tinte de referencia pasivo ROX, 300 nM de cada cebador de *P. ramorum*, 200 nM de cada cebador COX y 100 nM de cada una de las sondas de *P. ramorum* y COX).

- 5 Se realizó una PCR en tiempo real sobre un ABI 7900HT, con condiciones de ciclación de 10 min a 95°C seguidos por 40 ciclos de 2 pasos de 15 s a 95 ° C y 1 minuto a 60°C.

### Resultados

- 10 Los valores de *P. ramorum* y COX Ct para cada tira se muestran en la Figura 3 (las barras de error muestran las desviaciones estándar para reacciones repetidas (2 mitades de cada tira)). Se obtuvieron valores Ct muy similares utilizando un PVY LFD (datos no presentados).

- 15 Los valores Ct indican que el DNA hospedador (COX) y el DNA diana (*P. ramorum*) podían identificarse ambos a partir de la membrana del LFD con indiferencia de la localización de la muestra. Los resultados utilizando una muestra de *P. ramorum* en un PVY LFD eran muy similares, lo que indica que la especificidad del LFD, es decir los anticuerpos monoclonales específicos, no son críticos para la extracción de ácido nucleico.

### Ejemplo 2

- 20 Análisis de PVY
- Un LFD de virus Y de la patata (PVY), preparado como se ha descrito arriba en el Ejemplo 1, excepto que se utilizaron anticuerpos específicos para antígenos PVY, que se habían expuesto a un extracto de planta (patata) infectado con PVY (y que exhibía por tanto un resultado positivo) se almacenó a la temperatura ambiente en una bolsa de plástico sellada durante más de 6 años. Se retiró la membrana del LFD y se cortaron varias tiras de 1-2 mm de anchura de la misma. Cada tira se cortó por la mitad, y cada mitad de la tira se puso en un pocillo separado de una placa de 96 pocillos que contenía 25 μL de mezcla madre para RT-PCR en tiempo real (Taqman) para PVY (1 x tampón PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,001% gelatina), 0,02 U/μl transcriptasa inversa M-MLV, 0,025 U/μl Hot Taq, 0,2 mM de cada dNTP, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x ROX tinte de referencia pasivo, 300 nM de cada cebador PVY y 100 nM de sonda PVY), o PCR en tiempo real (Taqman) para el gen de citocromo-oxidasa (COX) de la planta (1 x tampón PCR, 0,025 U/μl Hot Taq, 0,2 mM de cada dNTP, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x ROX tinte de referencia pasivo, 300 nM de cada cebador COX y 100 nM de sonda COX). La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un ABI 7900HT, con condiciones de ciclación de 30 min a 48°C, seguidos por 10 min a 95°C, seguidos luego por 40 ciclos de 2 pasos de 15 s 95°C y 1 minuto a 60°C.

### Resultados

- 40 PVY y COX fueron detectados con éxito por RT-PCR y PCR, respectivamente. Los valores Ct de PVY y COX se muestran en la Tabla 1.

	Valores Ct (2 reacciones repetidas)
PVY (diana de RNA)	28,56, 26,14
COX (diana de DNA)	31,54, 31,45

Este resultado indica que el dispositivo de flujo lateral o LFD tiene ácido nucleico retenido de manera estable durante un periodo de tiempo prolongado.

5 Se tuvieron resultados satisfactorios similares con muestras recientes de PVY y también en un ensayo en tiempo real realizado sobre PVX (véanse las Figuras 9 y 10 respectivamente).

### **Ejemplo 3**

#### **Efecto de membranas/LFD**

Se repitió el experimento descrito en el Ejemplo 1 para la detección de *P. ramorum* utilizando como la muestra un extracto de rododendro inoculado con *P. ramorum*, como rango de membranas diferentes disponibles comercialmente, como sigue:

1	Millipore Corp. HiFlow 180
2	Millipore Corp. HiFlow 135
3	Millipore Corp. HiFlow 120
4	Millipore Corp. HiFlow 90
5	Millipore Corp. HiFlow 75
6	Millipore Corp. HiFlow 65
7	Schleicher & Schuell Prima 40

Cada membrana se trató con una solución convencional de bloqueo utilizada en la producción de LFD, y con o sin un tampón convencional utilizado para aplicar el sistema de etiquetado de látex de un LFD convencional. En un experimento posterior, se utilizaron también muestras de membrana Millipore Corp. Hiflow 75 y Millipore Corp. Hiflow 180, que no se habían tratado.

20 Se sometió también a tratamiento una gama de LFD disponible comercialmente como se describe en el Ejemplo 1. Éstos incluían el kit del test de gestación "Clearblue™", el kit de test de gestación en el hogar Tesco, un kit disponible comercialmente para detección del virus de la gripe aviar disponible de Anigen e ImmunoStrip del Virus del Mosaico del Pepino (CMV) producido por Agdia. Algunos de estos kits utilizaban etiquetas de oro como el mecanismo de señalización de proteínas, y otros utilizaban látex.

El ácido nucleico de *P. ramorum* se detectó con éxito en las muestras tomadas de todas las membranas y los LFDs arriba enumerados, con indiferencia del tamaño de poro o de la presencia o ausencia o naturaleza del régimen de pre-tratamiento de la membrana.

#### 5 **Ejemplo 4**

##### **Comparación con la detección de DNA puro**

10 Una muestra de DNA puro de *P. ramorum* se sometió a un ensayo Taqman™ para la detección de *P. ramorum* como se describe en el Ejemplo 1 junto con una membrana de un LFD tratada con un extracto bruto de rododendro sano al cual *P. ramorum*, también como se describe en el Ejemplo 1. La muestra se impurificó luego con una cantidad equivalente de DNA de *P. ramorum* antes de realizar el TaqMan™. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y se ilustran más adelante en la Figura 4.

15 Tabla 1

	Pendiente	Eficiencia de amplificación
DNA sólo	-3,5139	0,93
membrana	-3,451	0,95

(La eficiencia se calcula a partir de la pendiente de la curva estándar como  $10^{(-1/\text{pendiente})-1}$ )).

20 A partir de estos resultados está claro que la presencia de la membrana tiene un efecto insignificante sobre la eficiencia de la reacción de amplificación. Adicionalmente, la presencia de DNA de rododendro no inhibía la eficiencia del ensayo en modo alguno.

#### **Ejemplo 5**

##### 25 **Experimento de almacenamiento**

Un extracto bruto como el descrito en el Ejemplo 3 se sometió a un ensayo TaqMan como se describe en el Ejemplo 1 inmediatamente después de su preparación. El mismo se aplicó también a un LFD como se describe en el Ejemplo 1, y la membrana del dispositivo se sometió a un ensayo similar tan pronto como se hubo pasado la misma. Los resultados (Figura 5) muestran que, inmediatamente después de la preparación, ambas muestras daban resultados positivos.

35 Tanto el extracto bruto como la membrana se almacenaron luego a la temperatura ambiente durante 7 meses, y se repitió el análisis. Los resultados se muestran en la Figura 6 y la Figura 7, que es una gráfica de amplificación Taqman de los resultados que se muestran en la Figura 6.

Estos resultados muestran que la membrana actúa como un mecanismo eficaz de almacenamiento de ácido nucleico.

**Ejemplo 6**

**Detección de ácidos nucleicos en otros tipos de muestra**

5 Se añadió suero de ratón a un LFD, y se dejó pasar a lo largo del mismo. Una vez que se hubo absorbido la muestra, se retiró la membrana del alojamiento de plástico, y se sometió a un ensayo PCR TaqMan en tiempo real diseñado para detectar el gen eucariota de rRNA 18S. Éste es un ensayo de control endógeno pre-revelado disponible de Applied Biosystems. Se aplicó también un control negativo (agua) a un segundo LFD.

10 Los resultados se muestran en la Figura 8. Claramente, el suero es un tipo de muestra adecuado para uso en conexión con el presente método.

15 [El gen de rRNA 18S se encuentra en todos los eucariotas, lo que explica probablemente la ligera contaminación en el control negativo).

**Ejemplo 7**

**Métodos de detección diferentes**

20 Se realizaron una serie de ensayos diferentes en los cuales las muestras se pasaron a lo largo de las membranas de dispositivos LFD como se describe en el Ejemplo 1 y el ácido nucleico presente en dichas muestras se detectó luego utilizando PCR en tiempo real, específicamente el ensayo TaqMan, o PCR convencional, así como el ensayo LAMP.

25 Las reacciones PCR Taqman contienen típicamente 1 x Tampón A de Applied Biosystems (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl de pH 8,3, tinte de referencia pasivo carboxi-X-rodamina (ROX)), 0,025 U/μl AmpliTaq Gold de Applied Biosystems, 0,2 mM de cada dNTP, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300nM de cada cebador y 100nM sonda TaqMan. La PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) Taqman para detección de virus de RNA contiene también 0,02U/μL de transcriptasa inversa M-MLV. Las condiciones de ciclación eran 10 min a 25°C seguidos por 40 ciclos de 2 pasos de 15 s al 25°C y 1 minuto a 60°C. Esto fue precedido por un paso de transcripción inversa de 30 min a 40°C para RT-PCR. La PCR en tiempo real se realizó en un ABI 7900 HT.

30 Los resultados se interpretan en términos de valor Ct, es decir el ciclo para el cual la fluorescencia excede de un valor umbral.

35 Las reacciones LAMP contienen 0,32 U/μL de DNA-polimerasa Bst (New England Biolabs, Ipswich, MA), 1 x tampón Thermopol, 1,4 mM de cada dNTP, 6 mM MgCl<sub>2</sub> (con inclusión de 2 mM en tampón Thermopol), 1,2 M betaína, 200 nM de cada cebador externo (F3 y B3), 2 μM de cada cebador interno (FIP y BIP), y 1 μM de cada cebador de bucle (Bucle F y Bucle P). Las reacciones se incubaron a 65°C durante 40 min, luego a 80°C durante 25 min para desactivar la polimerasa Bst. Los productos amplificados se visualizaron por adición de 2 μL de reactivo de dsRNA Quant-iT PicoGreen (Invitrogen, Carlsbad, CA) y observación del cambio de color (de anaranjado a amarillo).

40

Las reacciones PCR contienen 1 x Tampón Fermentas PCR (10 mM Tris-HCl (pH 8,8 at 25°C), 50 mM KCl, 0,08% (v/v) Nonidet P40), 0,025 U/μl polimerasa Taq Fermentas, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, y 500 nM de cada cebador. Las condiciones de ciclación fueron 2 min a 25°C seguidos por 30 ciclos de 3 pasos de 30 s a 95°C, 30 s a 57°C, y 30 s a 72°C. Los productos se visualizaron por electroforesis en gel (gel de agarosa al 1,2%) seguida por tinción con bromuro de etidio (Figura 11).

En todos los casos, se tuvo éxito en la detección de ácidos nucleicos en la membrana.

Los ensayos y los tamaños de los amplicones se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Ensayo	Amplicón (pares de bases)
TaqMan de COX	-79
TaqMan de <i>P. ramorum</i>	77
TaqMan de PVY	67
TaqMan de PVX	71
PCR convencional de <i>P. ramorum</i>	~700
TaqMan de <i>A. tumefaciens</i>	60
TaqMan de rRNA 18S	<80
LAMP de <i>P. ramorum</i>	240

Se detectó una amplia gama de tamaños diferentes de amplicón en las membranas, lo que indicaba que el tamaño de los ácidos nucleicos no es importante en la determinación de si los mismos se retienen o no en la membrana.

### **Ejemplo 8**

#### **Ensayo de material de rosa de África Oriental en cuanto a la presencia del patógeno de las agallas de la corona, *Agrobacterium tumefaciens*, por extracción de DNA en LFDs y tarjetas FTA Whatman y PCR subsiguiente en tiempo real**

Los cultivos de rosas de toda el África Oriental se han visto afectados gravemente en los últimos años por una enfermedad conocida como agallas de la corona. Esta enfermedad está causada por cepas de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que albergan un fragmento circular pequeño de DNA conocido como plásmido Ti. Dado que estos plásmidos están albergados internamente por la bacteria, y debido también a que existen en la naturaleza muchas cepas de *Agrobacterium* avirulentas, el único modo de detectar el patógeno es por aislamiento de DNA bacteriano y ensayo posterior de este DNA en cuanto a la presencia del plásmido Ti.

Se realizó un viaje reciente a viveros de rosas en Kenia. Se tomaron muestras de las plantas de rosa afectadas y se administraron a un LFD basado en una membrana Millipore Hiflow 75 y también a tarjetas FTA Whatman. Éstas se

transportaron luego al Reino Unido para ensayos utilizando un ensayo PCR en tiempo real específico del plásmido Ti, conocido como el ensayo T-DNA, que detecta el patógeno *Agrobacterium*, o el ensayo PCR en tiempo real de DNA de plantas COX, que se utiliza como control interno para asegurar que el proceso de extracción de DNA ha funcionado satisfactoriamente.

5

#### Procesamiento de las membranas

(a) Dispositivo LFD. Se tomaron 2 discos de 1,25 mm de diámetro de cada una de membranas LFD inoculadas utilizando una punzonadora Harris Unicore. Estos discos se pusieron directamente en un pocillo de una placa PCR de 96 pocillos. Después de tomar muestras de todas las membranas, se añadieron 25 µL de mezcla madre para PCR en tiempo real a cada pocillo que contenía los discos. Las placas PCR se centrifugaron brevemente para asegurar que tanto los discos como la mezcla madre estaban localizados en fondo de cada pocillo. La placa se dispuso luego directamente en una máquina de PCR en tiempo real y se inició la reacción de ciclación.

15

(b) Tarjetas FTA Whatman. Se tomaron 2 discos de 1,25 mm de diámetro de cada tarjeta FTA inoculada utilizando una punzonadora Harris Unicore. Estos discos se pusieron directamente en un pocillo de una placa PCR de 96 pocillos. Después de tomar muestras de todas las membranas, se añadieron 200 µL de tampón de purificación Whatman a cada pocillo y las placas se incubaron a la temperatura ambiente durante 5 min. Después de 5 min se retiró el tampón de cada pocillo, teniendo cuidado a fin de asegurarse de que los discos permanecían en los pocillos. Este paso de purificación se repitió 2 veces más. Después del tercer paso de purificación, se añadieron a cada pocillo 200 µL de 1 x tampón TE y se incubaron las placas a la temperatura ambiente durante 5 min. Después de 5 min se retiró el tampón de cada pocillo, teniendo cuidado a fin de asegurarse de que los discos permanecían en los pocillos. Este paso se repitió una vez más. Después de retirar la última parte alícuota de tampón 1 x TE de los pocillos se secaron las placas, utilizando un bloque calentador de la máquina PCR, a 56°C durante 20 min. Una vez que se hubieron secado los discos, se añadieron a cada pocillo 25 µL de mezcla madre PCR en tiempo real a cada pocillo que contenía los discos. Las placas PCR se centrifugaron brevemente para asegurarse de que tanto los discos como la mezcla madre estaban localizados en el fondo de cada pocillo. La placa se puso luego directamente en una máquina PCR en tiempo real y se inició la reacción de ciclación.

30

#### Resultados

Se tomaron muestras de varios puntos diferentes de las plantas de rosa. Se encontró que las secciones de tallo, específicamente la unión de injerto en la que la variedad de floración está fusionada a una variedad de rizoma, era el punto más probable para detectar el patógeno de agallas de la corona, dado que la lesión creada por esta unión atrae la especie patógena de *Agrobacterium*, y por tanto el patógeno se congrega en este punto.

35

Los resultados presentados a continuación son de 10 secciones de tallo de 1-2 cm diferentes, maceradas y aplicadas a ambos dispositivos utilizando el tampón suministrado en las botellas del kit de DNA de 2 min. Cuatro de estas muestras se tomaron a través de una unión por injerto.

40

**Tabla 3.** Resultados de los ensayos PCR en tiempo real de T-DNA y COX de 10 secciones de tallo de rosa

Muestra	Resultados de la PCR en tiempo real y valores Ct			
	Muestras del kit LFD		Muestras de la tarjeta FTA Whatman	
	PCR DE T-DNA	PCR DE COX	PCR DE T-DNA	PCR DE COX
Tallo 1	Negativa	<b>+va</b> (25,62)	Negativa	<b>+va</b> (24,47)
Tallo 2	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Tallo 3	Negativa	<b>+va</b> (25,82)	Negativa	<b>+va</b> (32,86)
Tallo 4	Negativa	Negativa	Negativa	<b>+va</b> (30,44)
Tallo 5	Negativa	<b>+va</b> (27,56)	Negativa	Negativa
Tallo 6	Negativa	<b>+va</b> (27,63)	Negativa	<b>+va</b> (27,10)
Tallo 7 (GU) <sup>1</sup>	<b>+va</b> (34,75)	<b>+va</b> (26,74)	<b>+va</b> (37,11)	<b>+va</b> (27,98)
Tallo 8 (GU)	<b>+va</b> (39,51)	<b>+va</b> (27,35)	Negativa	<b>+va</b> (27,09)
Tallo 9 (GU)	<b>+va</b> (39,81)	<b>+va</b> (26,82)	<b>+va</b> (39,63)	<b>+va</b> (26,40)
Tallo 10 (GU)	Negativa	<b>+va</b> (25,46)	Negativa	<b>+va</b> (26,58)

<sup>1</sup> GU – Sección de tallo que incorpora una unión de injerto

5 Esto demuestra que los resultados obtenibles por el método de la invención son al menos tan satisfactorios, si no mejores, que los obtenidos utilizando una tarjeta FTA Whatman. El método era, sin embargo, mucho más sencillo de realizar, como se deduce claramente de los protocolos descritos.

Además, el uso de un LFD proporciona la ventaja adicional de que puede utilizarse al mismo tiempo un ensayo de diagnóstico preliminar de proteínas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para separar ácido nucleico de una muestra líquida, comprendiendo dicho método los pasos de aplicar una muestra líquida que contiene o se sospecha que contiene dicho ácido nucleico a una sección de recepción de la muestra de una membrana absorbente que no lleva agente de fijación específico alguno para ácidos nucleicos, hacer que dicha muestra líquida fluya a lo largo de la membrana absorbente, de tal manera que el ácido nucleico se distribuya por toda la longitud de la membrana y, después de ello, detectar el ácido nucleico depositado sobre o recuperar el ácido nucleico de una región de dicha membrana que está separada de la sección de recepción de la muestra.
- 5
- 10 2. Un método conforme a la reivindicación 1, en el cual la membrana se seca o se deja secar después que el líquido ha fluído a lo largo de la misma, antes de dicha detección o recuperación de ácido nucleico.
3. Un método conforme a la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual el ácido nucleico separado se somete a análisis ulterior.
- 15
4. Un método conforme a la reivindicación 3, en el cual el análisis ulterior se realiza utilizando una muestra de la membrana.
5. Un método conforme a la reivindicación 3, en el cual el ácido nucleico se eluye de la membrana antes de dicho análisis ulterior.
- 20
6. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la membrana se procesa a fin de mejorar el empapamiento rápido del líquido a lo largo de la misma.
- 25
7. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la muestra se selecciona de una muestra fisiológica o clínica o un extracto de tejido, un extracto de tejido de planta o animal, sangre, suero, orina, leche, saliva, un extracto fecal, una muestra del medio ambiente; o una muestra de agua o un extracto de suelo.
- 30
8. Un método conforme a la reivindicación 1, que se utiliza en un ensayo para detectar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método los pasos de hacer que una muestra líquida que se sospecha contiene dicho ácido nucleico fluya a lo largo de la membrana de un dispositivo de flujo de líquido, y detectar la presencia de un ácido nucleico específico en una región de dicha membrana que está separada de la sección de recepción de la muestra.
- 35
9. Un método conforme a la reivindicación 8, en el cual el ácido nucleico se detecta utilizando una reacción de amplificación de ácido nucleico.
10. Un método conforme a la reivindicación 9, en el cual la reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción en cadena de polimerasa.
- 40

11. Un método conforme a la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el cual un reactivo útil en dicha reacción de amplificación de ácido nucleico está presente en la membrana después que la muestra ha fluido a lo largo de la misma.
- 5 12. Un método conforme a la reivindicación 11, en el cual el reactivo útil en dicha reacción de amplificación de ácido nucleico es un cebador de amplificación.
13. Un método conforme a la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el cual dicho reactivo está presente en la membrana antes de la aplicación de la muestra.
- 10 14. Un método conforme a la reivindicación 13, en el cual dicho reactivo está presente en una sección de recepción de la muestra de la membrana y se transfiere a lo largo de la membrana en conjunción con la muestra.
- 15 15. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la membrana forma parte de un dispositivo de flujo de líquido que está dispuesto para realizar un ensayo para un analito adicional.
16. Un método conforme a la reivindicación 15, en el cual el ensayo es un inmunoensayo.
17. Un ensayo de dos etapas para detectar la presencia de un analito y un ácido nucleico en una muestra líquida, comprendiendo dicho método los pasos de (i) hacer que una muestra líquida que se sospecha contiene dicho analito y ácido nucleico fluya a lo largo de la membrana de un dispositivo de flujo de líquido capaz de conducir un ensayo para detectar la presencia de dicho analito, en el que la membrana no lleva agente alguno de fijación específica para ácidos nucleicos de tal manera que el ácido nucleico se distribuye en toda la longitud de la membrana y, (i i) detectar la presencia en la membrana de dicho ácido nucleico en una región de dicha membrana que está separada de una sección de recepción de la muestra del dispositivo de flujo de líquido.
- 20 25 18. Un ensayo conforme a la reivindicación 17, en el cual el ensayo del paso (i) es un inmunoensayo.
19. Un ensayo conforme a la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el cual dichos analito y ácido nucleico se derivan del mismo organismo, o en el cual uno del analito o ácido nucleico es característico de un organismo infeccioso particular, y el otro es característico de un hospedador de dicho organismo, o en el cual el analito es un pesticida aplicable a una planta y el ácido nucleico se encuentra en un gen de la planta.
- 30 20. Un kit para realizar un ensayo conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, que comprende una membrana absorbente que no lleva agente de fijación específico alguno para ácidos nucleicos; un reactivo útil en una reacción de amplificación de ácido nucleico presente en la membrana antes de la aplicación de una muestra, y en el cual la membrana absorbente es un elemento de un dispositivo de flujo de líquido, en que el dispositivo de flujo de líquido está configurado para realizar un inmunoensayo para detectar un polipéptido.
- 35 21. Un kit conforme a la reivindicación 20, en el cual el reactivo es un cebador para uso en la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana.
- 40

22. Un kit conforme a la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en el cual dicho reactivo está posicionado a lo largo de la longitud de la membrana.

5 23. Un kit conforme a la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en el cual el reactivo está presente en una sección de recepción de la muestra de la membrana, y es transferible a lo largo de la membrana en conjunción con la muestra.

FIGURA 1

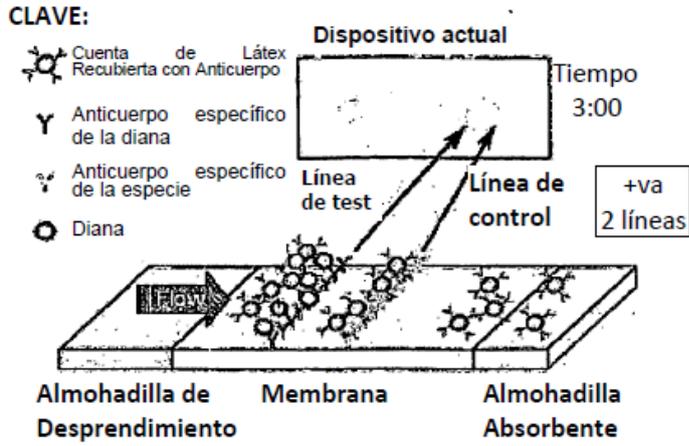


FIGURA 2

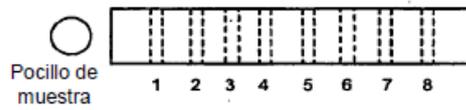


FIGURA 3

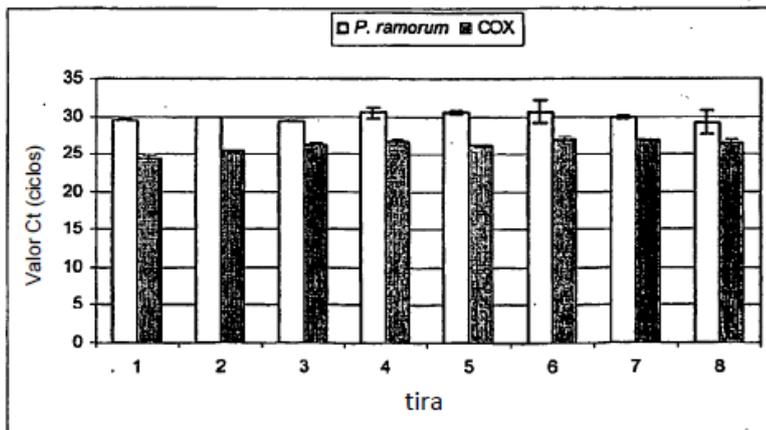


FIGURA 4

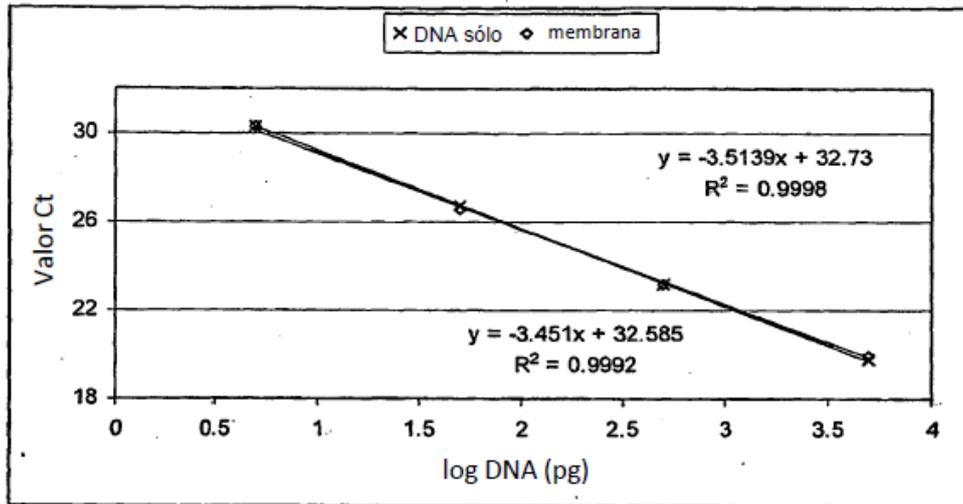


FIGURA 5

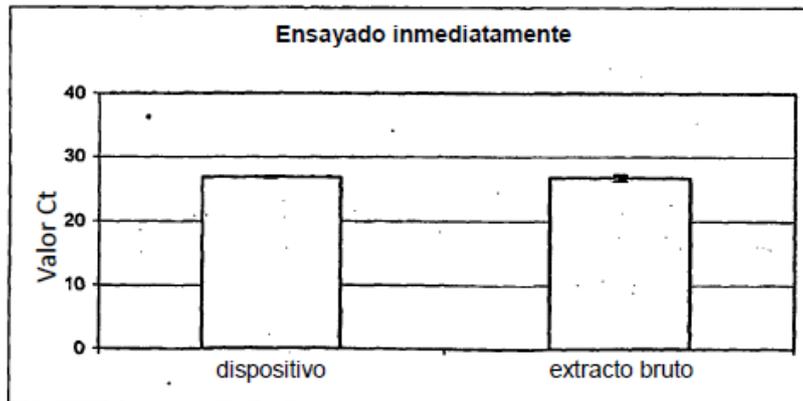


FIGURA 6

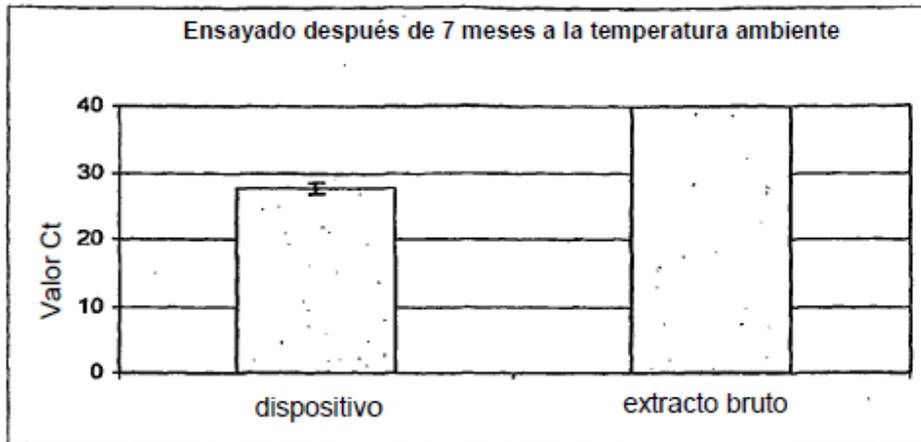


FIGURA 7

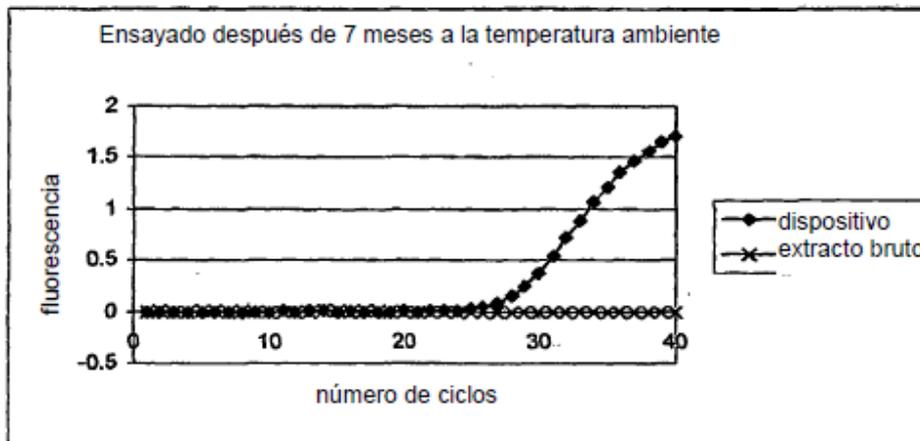


FIGURA 8

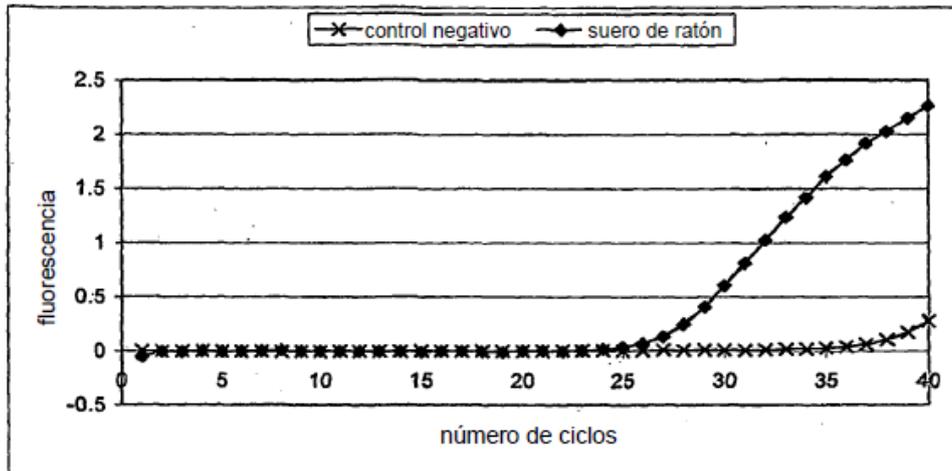


FIGURA 9

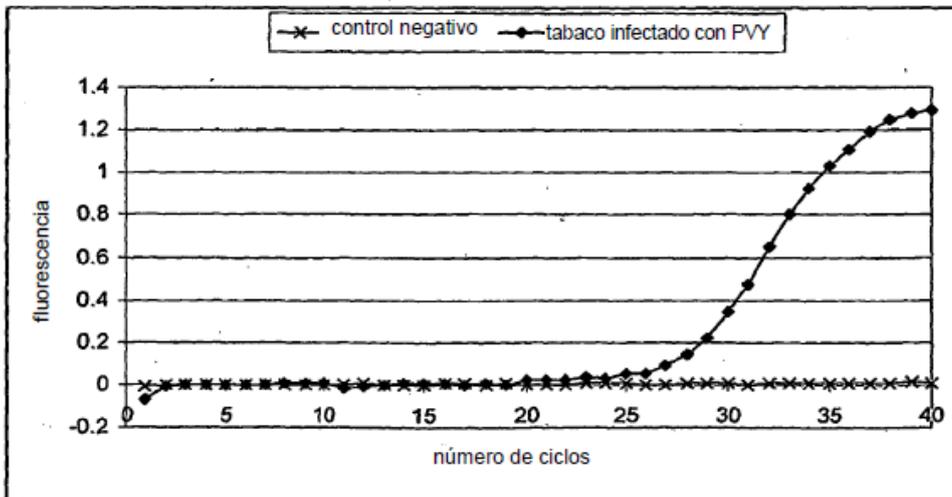


FIGURA 10

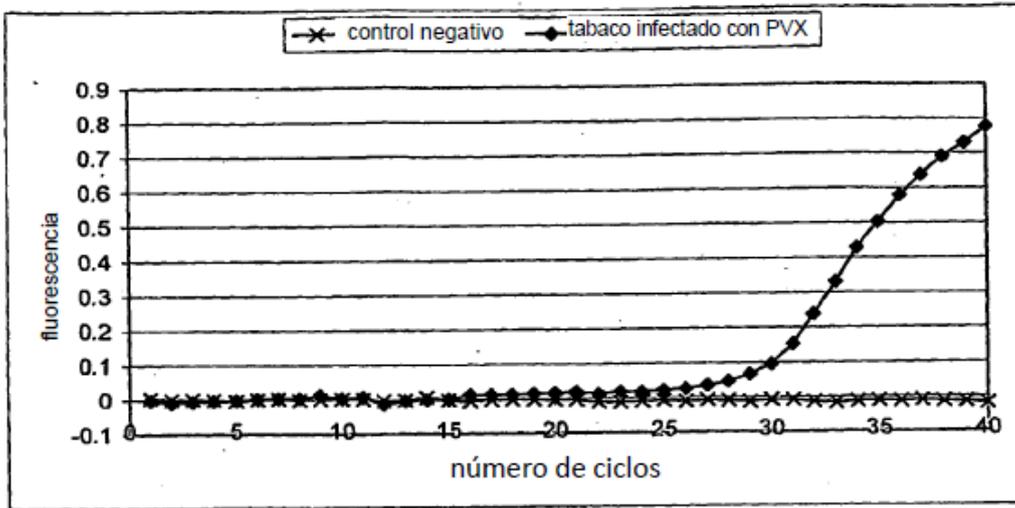


FIGURA 11

