

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 715**

51 Int. Cl.:
G01N 33/80 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04740826 .5**
96 Fecha de presentación: **08.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1646876**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2006**

54 Título: **DISPOSITIVO Y PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ANTÍGENOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS.**

30 Prioridad:
09.07.2003 DE 10330982

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2011

73 Titular/es:
**MEDION DIAGNOSTICS AG
BONNSTRASSE 9
3186 DÜDINGEN, CH**

72 Inventor/es:
**SCHWIND, Peter y
LÖSTER, Klemens**

74 Agente: **Fabrega Sabate, Xavier**

ES 2 368 715 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 y procedimiento para la determinación simultánea de antígenos de grupos sanguíneos

- 5 La invención se refiere a un dispositivo para ensayos multiparamétricos de flujo lateral–diagonal, particularmente en el campo de la serología de grupos sanguíneos, para la determinación cualitativa o cuantitativa simultánea de varios analitos en una muestra líquida, siendo los analitos antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos, que comprende una membrana con una zona de aplicación para la aplicación de la muestra líquida, al menos dos zonas
- 10 indicadoras que pueden interactuar con el analito o los analitos y al menos una región de absorción, que absorbe el líquido después de pasar por las zonas indicadoras, encontrándose las zonas indicadoras entre la zona de aplicación y una región de absorción, caracterizado porque las direcciones de flujo desde la zona de aplicación a través de las zonas indicadoras respectivas hasta una región de absorción (trayectorias de flujo) son esencialmente
- 15 paralelas y se presentan al menos dos trayectorias de flujo distintas, estando dispuestas las zonas indicadoras de modo que el líquido de muestra no atraviesa más de una zona indicadora por trayectoria de flujo, y las zonas indicadoras comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos y/o lectinas o fragmentos de las mismas contra antígenos de grupos sanguíneos.
- 20 La invención se refiere además a un procedimiento para la determinación de varios analitos en una muestra líquida, que comprende la aplicación de la muestra sobre la zona de aplicación de una membrana del dispositivo según la invención, en el que esta muestra se presenta en cantidad suficiente para inducir que el líquido de muestra fluya en dirección a la región de absorción a través de las zonas indicadoras y para inducir que los analitos o sus derivados en el líquido de muestra formen un complejo en las zonas indicadoras, particularmente para la determinación simultánea de antígenos de grupos sanguíneos.
- 25 En el diagnóstico serológico de grupos sanguíneos, se detectan de manera general parámetros que son de importancia especialmente en el contexto de transfusiones o de la enfermedad hemolítica neonatal. A este respecto, se trata entre otros de la detección de antígenos sobre la superficie de eritrocitos que son característicos de los grupos sanguíneos. Otros sistemas de antígenos importantes se localizan también sobre trombocitos, granulocitos, linfocitos, que igualmente desempeñan un papel en transfusión y/o trasplante.
- 30 De forma conocida, para la determinación de los antígenos de grupos sanguíneos se combinan los eritrocitos de la persona a ensayar (donante o receptor) con reactivos que contienen anticuerpos específicos de grupo sanguíneo. Habitualmente, se trata de ensayos líquidos en los que se prepara una preparación de ensayo mediante mezclado de una muestra que contiene eritrocitos con una muestra que contiene anticuerpos que están dirigidos contra una característica de grupo sanguíneo determinado. La preparación de ensayo se incuba después durante un intervalo
- 35 definido y en condiciones definidas y después del término de la incubación, o directamente o después de una etapa de centrifugación, se examina o visualmente o con procedimientos ópticos una eventual aglutinación o adsorción de los eritrocitos. La medida de punto final predominante en la serología de grupos sanguíneos es como siempre la hemaglutinación. Para cada uno de los grupos sanguíneos a determinar, debe pipetarse una preparación propia, es decir, por ejemplo la determinación de los 9 grupos sanguíneos más importantes A, B, D, C, c, E, e, Cw y K requiere
- 40 9 preparaciones separadas sin el control.
- 45 Los ensayos de flujo lateral encuentran numerosas aplicaciones hoy en día como ensayos rápidos, por ejemplo, como ensayos de embarazo, para la determinación de marcadores de infección o como cribado de drogas. Una disposición de ensayo de flujo lateral está compuesta de forma conocida por un soporte sólido al que se aplica una zona de aplicación para la muestra a examinar y una membrana de separación sobre la que están unidos elementos de unión, por ejemplo, anticuerpos o antígenos de captura, y sobre la que pueden detectarse reacciones de unión, y una región de absorción capaz de succión, que hace fluir la muestra a examinar a través de la membrana de separación.
- 50 Las membranas de ensayo de ensayos de flujo lateral convencionales se describen generalmente con una separación similar a la cromatografía. El analito en la muestra se une específicamente a los elementos de unión fijados sobre una membrana, que generalmente se presentan dispuestos en bandas consecutivas o superpuestas en forma de zonas indicadoras. El complejo de formación se visualiza mediante partículas indicadoras que generalmente están ya presentes en la disposición deshidratadas en una almohadilla de liberación de conjugado. La almohadilla de liberación de conjugado está típicamente fijada entre la zona de aplicación y la membrana. Las partículas indicadoras coloreadas prerrecubiertas están recubiertas, por ejemplo, con un anticuerpo dirigido contra los analitos buscados.
- 55 El formato habitual de ensayo de flujo lateral es el denominado “ensayo de sándwich”, en el que tanto la zona indicadora como las partículas indicadoras están cubiertas con ligandos dirigidos contra los analitos buscados, normalmente un anticuerpo. A este respecto, el ligando (elemento de unión) está inmovilizado en la membrana. El reactivo detector, normalmente un anticuerpo que está unido a partículas de poliestireno coloreadas o metales coloidales, está depositado en la almohadilla de liberación de conjugado de manera que se puede quitar por lavado. Este complejo de unión sirve como partícula indicadora. Después de la aplicación de la muestra a examinar, ésta
- 60 última humedece muy rápidamente la almohadilla de liberación de conjugado, con lo que se movilizan las partículas indicadoras. Las partículas indicadoras migran con el frente líquido a lo largo de la membrana porosa. Un analito localizado en la muestra se une al anticuerpo que está acoplado a la partícula indicadora. Cuando la muestra pasa por la zona indicadora, se inmoviliza el complejo de analito/partícula indicadora en la zona indicadora mediante la reacción del analito con el anticuerpo unido en la zona indicadora, lo que conduce a una señal visible.
- 65 70 Es un formato de ensayo conocido adicional para analitos pequeños con sólo un determinante antigénico único que no pueden unirse simultáneamente a dos anticuerpos, el denominado “ensayo de competición”. El reactivo detector unido a la partícula indicadora es normalmente una molécula idéntica o análoga al analito. Las partículas indicadoras están depositadas en la almohadilla de liberación de conjugado. Las partículas indicadoras migran con el frente líquido a lo largo de la membrana porosa. Cuando la muestra que contiene analito, y las partículas indicadoras (que

también contienen eficazmente analito) pasan por la zona indicadora, se une una parte de las moléculas de analito de la muestra y una parte de las partículas indicadoras. Cuanto más analito se localice en la muestra, más eficaz competirá con la unión de las partículas indicadoras y más débil será la señal.

5 De forma conocida, estas partículas indicadoras son predominantemente de oro coloidal o poliestireno, que se preparan y recubren con procedimientos conocidos por el experto. En los formatos de ensayos de flujo lateral típicos, se determinan indirectamente los analitos. Por determinación directa de un analito se entiende aquí que el analito está ya unido naturalmente a la partícula indicadora (por ejemplo, eritrocito). En el caso más común de determinación indirecta del analito, la muestra a ensayar contiene generalmente un componente no unido a célula, por ejemplo plasmático, como analito y son necesarios además de la muestra a ensayar dos componentes reactivos, a saber partículas indicadoras y elemento de unión. En la determinación indirecta, se une el analito en primer lugar a las partículas indicadoras disociadas de la almohadilla de liberación de conjugado, antes de inmovilizarse entonces en las zonas indicadoras este complejo mediante una segunda reacción con el elemento de unión.

15 Con el uso de ensayos de flujo lateral convencionales con eritrocitos como partículas indicadoras que se han unido a los analitos a determinar, por ejemplo, antígenos específicos de grupos sanguíneos, se disponen hasta la fecha en las zonas indicadoras anticuerpos contra antígenos de los correspondientes grupos sanguíneos como elementos de unión en bandas consecutivas o superpuestas sólo en una trayectoria de flujo como, por ejemplo, anti-A, anti-B contra los antígenos de grupos sanguíneos A o B, o anticuerpos contra antígenos del sistema de grupos sanguíneos Rh. A este respecto, los ensayos de flujo lateral convencionales presentan la desventaja de que los eritrocitos unidos a anticuerpos forman en una muestra una barrera de flujo para los analitos a examinar adicionales, por ejemplo, antígenos asociados a células adicionales. Mediante la aglutinación o adsorción de células en una banda que se encuentra proximal a la zona de aplicación de los elementos de unión, no pueden separarse sin trabas y visiblemente analitos adicionales, particularmente células o fragmentos celulares, en la muestra a examinar, y no pueden en consecuencia detectarse clara ni completamente. Esto puede conducir, por ejemplo en una persona que es positiva del grupo sanguíneo AB Rh D positivo, a una atenuación o eliminación de las bandas B y D, lo que podría conducir a una interpretación errónea en el sentido del grupo sanguíneo A Rh negativo. Hasta la fecha, por tanto, no se han podido emplear ensayos de flujo lateral con más de una zona indicadora, especialmente en el diagnóstico serológico de grupos sanguíneos. Para la medida de varios parámetros de grupos sanguíneos, particularmente celulares y plasmáticos, deben llevarse a cabo hasta la fecha ensayos de parámetros individuales separados.

25 Es objetivo de la invención superar las desventajas indicadas con respecto al estado de la técnica, particularmente de ensayos de flujo lateral convencionales de zonas indicadoras o detectoras consecutivas o superpuestas para una medida simultánea de distintos parámetros de muestra, particularmente de parámetros celulares y plasmáticos.

35 Se consigue el objetivo según la invención, por una parte, mediante un dispositivo para la determinación cualitativa o cuantitativa simultánea de uno o varios analitos en una muestra líquida o en varias muestras líquidas, que comprende una membrana con una zona de aplicación para aplicar la muestra líquida, al menos dos zonas indicadoras que pueden interaccionar con el analito o con los analitos, o con sus analitos, y al menos una región de absorción, que absorbe el líquido después de pasar por las zonas indicadoras, en el que las zonas indicadoras se encuentran entre la zona de aplicación y la región de absorción, caracterizado porque las direcciones de flujo desde la zona de aplicación a través de las zonas indicadoras respectivas hasta la región de absorción, que representan trayectorias de flujo, son esencialmente paralelas y se presentan al menos dos trayectorias de flujo distintas, y las zonas indicadoras comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra antígenos de grupo sanguíneo y/o lectinas o fragmentos de las mismas contra antígenos de grupo sanguíneo.

40 Las zonas indicadoras del dispositivo según la invención se localizan sobre la membrana y comprenden elementos de unión que captan o se unen a los analitos a determinar en la muestra. En las zonas indicadoras, se detectan las reacciones de unión entre analito y elemento de unión.

50 En un modo de realización de la invención, se disponen las zonas indicadoras de modo que el líquido de muestra no atraviese más de una zona indicadora por trayectoria de flujo. Por ejemplo, las zonas indicadoras se disponen escalonadas sobre la membrana. La disposición de las zonas indicadoras se configura preferiblemente a este respecto en una serie que se extiende de proximal a distal o viceversa de manera diagonal. Son formas de realización especiales las configuradas en forma de V, en forma de W, M o N o en forma de \bar{V} , en forma de \bar{W} , \bar{M} o \bar{N} inversas. En una forma de realización adicional, se escalonan las zonas indicadoras paralelamente entre sí dispuestas en una serie lineal.

60 La introducción de zonas indicadoras escalonadas hace posible por primera vez un ensayo multiparamétrico con eritrocitos como partículas indicadoras en una disposición lateral. La forma de realización especialmente preferida de una disposición diagonal tiene la ventaja de que la caracterización de los resultados puede aplicarse de forma especialmente práctica y fácilmente legible a la disposición según la invención, ya que cada parámetro a detectar presenta una posición X e Y definida y la disposición del dispositivo según la invención se considera como un sistema de coordenadas con ordenada (plano de la dirección de flujo) y abscisa (plano de la zona de aplicación).

65 Las zonas indicadoras comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y/o lectinas o fragmentos de las mismas que capturan o se unen a los antígenos de grupos sanguíneos a determinar y por tanto a las células que los portan en la muestra. Como elementos de unión preferidos, se fijan anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y/o lectinas o fragmentos de las mismas contra antígenos de todos los sistemas de grupos sanguíneos concebibles. Preferiblemente, se aplica en una zona indicadora, preferiblemente en una zona indicadora situada distalmente a todas las zonas indicadoras restantes, un elemento de unión de control (control = ctl) que indica positivamente el flujo de la muestra a través de las zonas indicadoras. El elemento de control es preferiblemente un anticuerpo policlonal antieritrocítico.

75 En una forma de realización preferente, una zona indicadora comprende, a este respecto, respectivamente, un elemento de unión, preferentemente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, contra uno de los analitos que se

van a examinar. Las formas de realización preferentes de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y/o lectinas o fragmentos de las mismas en las zonas indicadoras son anticuerpos o lectinas contra antígenos del sistema de grupos sanguíneos ABO del sistema Rh, Kell, Lewis, Hh, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, P. Además preferentes como elementos de unión de las zonas indicadoras son anticuerpos contra antígenos de los sistemas de grupos sanguíneos Diego, Yt, Scianna, Dombrock, Colton, Chido/Rodgers, Gerbich, Cromer, Knops, Landsteiner-Wiener, Xg, Kx, Indian, Ok, Raph, John Milton Hagen, Langereis y/o Sid. Un forma de realización particularmente preferente del dispositivo según la invención comprende zonas indicadoras con los elementos de unión anticuerpos anti-A, -B, -AB, -D, -D, -C, -c, -E, -e, -Cw y/o -K o sus fragmentos de anticuerpos, siendo ambos anti-D dos anticuerpos o sus fragmentos de anticuerpos diferentes. En particular en el caso de pacientes, embarazadas o neonatos, éstos son preferentemente anticuerpos monoclonales de la clase IgM, que no incluyen la categoría D^{VI}. En el caso de donantes éste es preferentemente un anticuerpo que incluye la categoría D^{VI} y un anticuerpo que no incluye la categoría D^{VI}.

Mediante el dispositivo según la invención, ya no tiene que pipetearse separadamente para cada determinación individual para la determinación de grupos sanguíneos, sino que en una muestra pueden determinarse simultáneamente una gran cantidad de antígenos deseados de sistemas de grupos sanguíneos a examinar, por ejemplo las características más importantes de grupos sanguíneos de los sistemas de grupos sanguíneos ABO, Rh y Kell (A, B, AB, D, C, c, E, e, Cw, K).

Esto representa una excepcional racionalización de los procedimientos de trabajo. También la lectura de los resultados representados en disposición diagonal es esencialmente más ventajosa. Así, en el dispositivo según la invención, pueden determinarse y leerse conjuntamente en un dispositivo, por ejemplo, propiedades de ABO y Rh. La asignación de los resultados al paciente en cuestión se facilita. El resultado bidimensional plano, así como el punto final estable de la reacción facilitan no sólo la lectura a simple vista sino también una lectura automatizada de los resultados con procedimientos de análisis de imagen comunes como, por ejemplo, cámaras CCD. Se reduce el coste de trabajo, incluso con evaluación manual. El dispositivo según la invención conduce además a una reducción del impacto ambiental y a efectos económicos. Incluso en situaciones de emergencia bajo presión de tiempo, puede llevarse a cabo en poco tiempo en un único dispositivo de ensayo, por ejemplo, una determinación completa de grupo sanguíneo ABO/sub grupo Rh. Desde el punto de vista de la producción técnica, la configuración de flujo lateral-diagonal tiene ventajas esenciales frente al estado de la técnica, implicando por un lado un consumo considerablemente reducido de los reactivos usados y mediante la provisión de una pluralidad de parámetros de ensayo en un único dispositivo.

Mediante el dispositivo según la invención, se proporciona un ensayo de flujo lateral, particularmente para el diagnóstico y serológico de grupos sanguíneos, con el que pueden determinarse en una preparación de ensayo simultáneamente varios parámetros celulares, particularmente antígenos o epítomos antigénicos eritrocíticos, plasmáticos y/o propiedades de células sanguíneas, particularmente de componentes de sangre completa, por muestra a examinar. Además, se proporciona por tanto un sistema de ensayo de fabricación lo más sencilla posible y sencillo de manejar, particularmente con pocas series de ensayos y sin preparación de muestra, y económico con el que pueden determinarse simultáneamente distintos parámetros celulares y/o parámetros plasmáticos de una muestra o varias muestras a examinar, en particular características de grupos sanguíneos.

La membrana del dispositivo según la invención es una membrana porosa. Son materiales de membrana preferidos, por ejemplo, nitrocelulosa (por ejemplo, UniSart de Sartorius, HiFlow de Millipore, Whatman, AE99 o FF85/100 de Schleicher & Schuell), polietileno (Lateral Flo de Porex Corporation) o nailon (Novylon de CUNO). Preferiblemente, la membrana presenta un tamaño de poro lo mayor posible, ya que una alta porosidad de la membrana facilita la penetración particularmente de componentes celulares de la muestra a determinar, por ejemplo de eritrocitos, en la estructura porosa. Es especialmente ventajoso el uso de membranas absorbentes. Sin embargo, el dispositivo según la invención no está limitado a estas propiedades. Se prefieren todas las membranas con alta velocidad de flujo capilar ("Capillary Speed"), en el que la velocidad de flujo capilar es el tiempo que necesita una solución coloreada para atravesar 40 mm de una membrana dada. Se prefieren especialmente membranas cuya velocidad de flujo capilar es < 100.

En un modo de realización preferido de la invención, está dispuesto sobre la membrana porosa un elemento sellante en la dirección de flujo detrás de la zona de aplicación y delante de las zonas indicadoras del dispositivo según la invención. Se usan elementos sellantes bi- o tridimensionales que se colocan sobre la membrana porosa y con los que se forma una zona de aplicación de muestra que es separada del área restante de la de la membrana porosa. El elemento sellante tiene principalmente según la invención el efecto de una barrera líquida y permite la distribución dirigida del líquido de muestra y los reactivos de ensayo en la membrana porosa. Además, el elemento sellante según la invención sella la zona de aplicación de muestra para evitar una entrada de líquido indeseada en las otras regiones de la disposición del dispositivo de flujo lateral.

Son modos de realizaciones preferidos del elemento sellante las formas de barra o artesa o embudo. La conformación del elemento sellante se realiza mediante procesos de corte a partir del material usado en la fabricación del elemento sellante. En el caso de forma de embudo o artesa, el elemento sellante recibe un orificio interno cuyas variantes de forma de realización preferidas son redonda, cuadrada o rectangular, en el caso de forma de embudo, formas que se estrechan hacia el lado inferior (lado de contacto con la membrana) del elemento sellante.

Son materiales preferidos para el elemento sellante materiales que no absorben agua (hidrófobos). En un modo de realización preferido, los materiales están recubiertos por un lado con una película adhesiva, por ejemplo un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Por tanto, el elemento sellante puede adherirse directamente sobre la superficie de la membrana porosa. Como alternativa, el elemento sellante puede unirse a la carcasa de flujo lateral, por ejemplo adherirse, en el que en esta forma de realización la carcasa de flujo lateral comprime la superficie de la membrana porosa y por tanto consigue las funciones del elemento sellante.

Son materiales preferidos para la formación de elementos sellantes bidimensionales cualquier forma de cinta

adhesiva o láminas adhesivas (por ejemplo, Tesa 4124 de Beiersdorf AG, ARcare 7815 de Adhesives Research).

5 Son materiales preferidos para la formación de elementos sellantes tridimensionales materiales elastoméricos flexibles de poros cerrados o materiales de silicona flexibles con distintos grosores de material, preferiblemente 3–5 mm (por ejemplo, caucho celular EPDM140 de Pitzner, caucho de silicona o caucho completo, de dureza 40° o menos, de Castan).

10 Por la estructura según la invención, el dispositivo según la invención es capaz de absorber muestras líquidas que contienen células como, por ejemplo, sangre completa, sin separar por filtrado las células. Además, el elemento sellante permite la aplicación de grandes volúmenes de muestra sobre la membrana porosa (zona de aplicación) sin inundar ésta. Por tanto, el elemento sellante apoya la utilización de las propiedades absorbentes de la membrana porosa. Además, el elemento sellante garantiza un flujo de muestra dirigido. El dispositivo según la invención puede funcionar bien sin embargo con o sin elemento sellante.

15 Para la región de absorción (almohadilla de absorción) del dispositivo según la invención, se prefieren materiales mecánicamente estables, preferiblemente con capacidades de absorción de agua de 20–30 g/100 cm² (por ejemplo, papel Wicking, de tipo 300, Schleicher und Schüll). El contacto entre la almohadilla de absorción y la membrana de flujo lateral del dispositivo según la invención se produce mediante presión y superposición con la membrana porosa. La colocación exacta de la almohadilla de absorción sobre la membrana se consigue mediante la adhesión de la almohadilla de absorción con la capa de soporte (“backing sheet”) que porta la membrana de flujo lateral.

20 En un modo de realización adicional, se aplican los componentes del dispositivo según la invención con fines de reforzamiento mecánico sobre un sustrato o capa de soporte. El dispositivo según la invención puede funcionar sin embargo con o sin capa de soporte. Se prefieren materiales mecánicamente estables y no absorbentes de agua, preferiblemente con grosores de material de 100 µm o más, que están recubiertos por uno o los dos lados con una película adhesiva, por ejemplo, un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo [por ejemplo, poliéster W/GL–187 de 0,005”, G & L]. Se fijan sobre la capa de soporte la membrana porosa y la almohadilla de absorción. En caso de capa de soporte adhesiva por los dos lados, se utiliza el segundo lado adhesivo para la fijación de la pila a áreas adicionales, por ejemplo, dentro de la carcasa de flujo lateral.

25 En un modo de realización adicional, se integra en una carcasa el dispositivo según la invención, con o sin capa de soporte sobre la que se han aplicado los componentes del dispositivo según la invención, mediante la que los componentes de membrana se comprimen entre sí y la carcasa soporta la función del elemento sellante. A este respecto, el dispositivo según la invención puede funcionar igualmente bien sin embargo con o sin carcasa.

30 Otro objeto de la invención es el uso de un dispositivo según la invención para el análisis de sangre, en particular para la determinación simultánea de antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos de todos los sistemas de grupos sanguíneos posibles, preferentemente de cualquier tipo de analito sobre la superficie de los glóbulos rojos. Los antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos son, por ejemplo, los del sistema de grupos sanguíneos ABO del sistema Rh, Kell, Lewis, Hh, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, P, de los sistemas de grupos sanguíneos Diego, Yt, Scianna, Dombrock, Colton, Chido/Rodgers, Gerbich, Cromer, Knops, Landsteiner-Wiener, Xg, Kx, Indian, Ok, Raph, John Milton Hagen, Langereis y/o Sid, en particular A1, A2, B, D, C, c, E, e, Cw, K, k, M, N, S, s, Jk(a), Jk(b), Fy(a), Fy(b), Kp(a), Kp(b), Js(a), Js(b), Le(a), Le(b), Lu(a), Lu(b), P1, I, H, Xg(a), Vw, Wr(a), Lan.

35 Una forma de realización preferente del dispositivo según la invención determina simultáneamente varias características de grupos sanguíneos, por ejemplo, A, B, AB, D, C, c, E, e, Cw y K. La muestra que se va a analizar, por ejemplo, sangre completa nativa o anticoagulada o concentrado de eritrocitos o suspensiones de eritrocitos diluidas, se aplica en la zona de aplicación del dispositivo según la invención. Los eritrocitos que contiene la muestra, que portan el analito o los analitos, sirven al mismo tiempo como partículas indicadoras.

40 El objetivo se consigue según la invención por otro lado mediante un procedimiento para la determinación de varios analitos o sus derivados en una muestra líquida que comprende la aplicación de la muestra sobre la zona de aplicación de una membrana del dispositivo según la invención, en el que esta muestra se presenta en cantidad suficiente para inducir que el líquido de muestra fluya en dirección a la región de absorción a través de las zonas indicadoras y para inducir que los analitos o sus derivados en el líquido de muestra se unan a las zonas indicadoras respectivas o formen un complejo en las zonas indicadoras.

45 En el caso del procedimiento según la invención se trata en el caso de los analitos que se van a determinar, en particular, de antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos de todos los sistemas de grupos sanguíneos, preferentemente los que se encuentran sobre la superficie de los glóbulos rojos. Los antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos son, por ejemplo, los de los sistemas de grupos sanguíneos ABO del sistema Rh, Kell, Lewis, Hh, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran, P, de los sistemas de grupos sanguíneos Diego, Yt, Scianna, Dombrock, Colton, Chido/Rodgers, Gerbich, Cromer, Knops, Landsteiner-Wiener, Xg, Kx, Indian, Ok, Raph, John Milton Hagen, Langereis y/o Sid, en particular A1, A2, B, D, C, c, E, e, Cw, K, k, M, N, S, s, Jk(a), Jk(b), Fy(a), Fy(b), Kp(a), Kp(b), Js(a), Js(b), Le(a), Le(b), Lu(a), Lu(b), P1, I, H, Xg(a), Vw, Wr(a), Lan.

50 Una forma de realización preferente del procedimiento según la invención determina simultáneamente varias características de grupos sanguíneos, por ejemplo, A, B, AB, D, C, c, E, e, Cw y K. La muestra que se va a analizar, por ejemplo, sangre completa nativa o anticoagulada o concentrado de eritrocitos o suspensiones de eritrocitos con o sin líquido de ensayo, tal como sangre de control, se aplica a la zona de aplicación del dispositivo según la invención. Los eritrocitos que contiene la muestra, que portan el analito o los analitos, sirven simultáneamente como partículas indicadoras.

55 A continuación, se explica más concretamente la invención mediante figuras y ejemplos, sin limitarla. Se muestra en:

70 La Fig. 1 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral para la

determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE;

- 5 La Fig. 2 una vista en despiece del dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral representado en la Fig. 1;
- La Fig. 3 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE, realizada con un elemento sellante tridimensional en forma de barra;
- 10 La Fig. 4 una vista en despiece del dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral representado en la Fig. 3;
- La Fig. 5 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE, realizada con un elemento sellante tridimensional en forma de artesa;
- 15 La Fig. 6 una vista en despiece del dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral representado en la Fig. 5;
- 20 La Fig. 7 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D, C, c, E, e, Cw y K;
- La Fig. 8 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral realizado como ensayo clínico para la examinación de la identidad AB0 del receptor y de la bolsa de sangre;
- 25 La Fig. 9 una vista en despiece del dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral representado en la Fig. 8.
- La Fig. 10 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE;
- 30 La Fig. 11 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE;
- 35 La Fig. 12 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE;
- La Fig. 13 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE;
- 40 La Fig. 14 una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral con flujo bidireccional para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE;
- 45 La Fig. 15 una vista en despiece del dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral representado en la Fig. 14.

50 En la Fig. 1, se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo según la invención para ensayos de flujo lateral para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE. En el presente ejemplo, el dispositivo está compuesto por una capa de soporte 1, la membrana porosa 2, la almohadilla de absorción 3 y el elemento sellante 4 bidimensional realizado en forma de barra. A este respecto, la membrana porosa 2 está fijada sobre la capa de soporte 1 dotada de un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Igualmente, la almohadilla de absorción 3 está fijada sobre la capa de soporte 1, en la que una parte de la almohadilla de absorción 3 se superpone a la membrana porosa. El elemento sellante 4 fijado sobre el lado superior de la membrana porosa 2 separa la zona de aplicación 5 del área de membrana restante y posibilita la distribución dirigida del líquido de muestra y los reactivos de ensayo en la membrana porosa 2. Entre la zona de aplicación 5 y la región de membrana porosa 2 que está en contacto con la almohadilla de absorción 3, se dispone la región de zonas indicadoras 6. Esta está formada por las zonas indicadoras I–VI en forma de punto dispuestas diagonalmente escalonadas en posiciones X e Y definidas, consistiendo las zonas indicadoras en los siguientes elementos de unión:

55

60

Zona indicadora	Elemento de unión	Especificación
I	Anticuerpo	Anti–A (monoclonal)
II	Anticuerpo	Anti–B (monoclonal)
III	Anticuerpo	Anti–AB (monoclonal)
IV	Anticuerpo	Anti–D (monoclonal)
V	Anticuerpo	Anti–CDE (monoclonal)
VI	Anticuerpo	Anti–eritrocitos (policlonal)

65 La zona indicadora VI es el control (ctl) y contiene anticuerpos anti–eritrocitos policlonales. Se localiza dispuesta distalmente a todas las zonas indicadoras restantes.

En la Fig. 2, se muestra una vista en despiece del dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención representado en la Fig. 1, que está compuesto por los componentes capa de soporte 1, membrana porosa 2, almohadilla de absorción 3 y elemento sellante 4 que separa la zona de aplicación 5 del resto de la membrana, que a su vez contiene la región de zonas indicadoras 6 con las zonas indicadoras I–VI dispuestas diagonalmente

escalonadas.

En la Fig. 3, se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE. En el presente ejemplo, los componentes del dispositivo corresponden a los componentes del dispositivo representado en la Fig. 1 con excepción del elemento sellante 4 fijado sobre el lado superior de la membrana porosa 2 realizado en forma de barra tridimensional.

En la Fig. 4, se muestra una vista en despiece del dispositivo para ensayos de flujo lateral según la reivindicación representado en la Fig. 3, con los componentes capa de soporte 1, membrana porosa 2, almohadilla de absorción 3 y elemento sellante 4 realizado en forma de barra tridimensional que separa la zona de aplicación 5 del resto de la membrana, que a su vez contiene la región de zonas indicadoras 6 con las zonas indicadoras I–VI dispuestas diagonalmente escalonadas.

En la Fig. 5, se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE. En el presente ejemplo, los componentes corresponden a los componentes del dispositivo representado en la Fig. 1 con excepción del elemento sellante 4 fijado sobre el lado superior de la membrana porosa 2 realizado en forma de artesa tridimensional.

En la Fig. 6, se muestra una vista en despiece del dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención representado en la Fig. 5, con los componentes capa de soporte 1, membrana porosa 2, almohadilla de absorción 3 y elemento sellante 4 realizado en forma de artesa tridimensional que separa la zona de aplicación 5 del resto de la membrana, que a su vez contiene la región de zonas indicadoras 6 con las zonas indicadoras I–VI dispuestas diagonalmente escalonadas.

En la Fig. 7, se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D, C, c, E, e, Cw y K. En el presente ejemplo, el dispositivo está compuesto por una capa de soporte 1, la membrana porosa 2, la almohadilla de absorción 3 y el elemento sellante 4 realizado en forma de barra bidimensional. A este respecto, la membrana porosa 2 está fijada sobre la capa de soporte 1 dotada de un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Igualmente, la almohadilla de absorción 3 está fijada sobre la capa de soporte 1, superponiéndose una parte de la almohadilla de absorción 3 con la membrana porosa 2. El elemento sellante 4 fijado sobre el lado superior de la membrana porosa 2 separa la zona de aplicación 5 del resto del área de membrana y posibilita la distribución dirigida de líquido de muestra y reactivos de ensayo en la membrana porosa 2. Entre la zona de aplicación 5 y la región de membrana porosa 2 que está en contacto con la almohadilla de absorción 3, se dispone la región de zonas indicadoras 6. Ésta está formada por las zonas indicadoras I–XI en forma de punto dispuestas diagonalmente escalonadas en posiciones X e Y definidas, estando compuesta las zonas indicadoras por los siguientes elementos de unión:

Zona indicadora	Elemento de unión	Especificación
I	Anticuerpo	Anti-A (monoclonal)
II	Anticuerpo	Anti-B (monoclonal)
III	Anticuerpo	Anti-AB (monoclonal)
IV	Anticuerpo	Anti-D (monoclonal)
V	Anticuerpo	Anti-C (monoclonal)
VI	Anticuerpo	Anti-c (monoclonal)
VII	Anticuerpo	Anti-E (monoclonal)
VIII	Anticuerpo	Anti-e (monoclonal)
IX	Anticuerpo	Anti-Cw (monoclonal)
X	Anticuerpo	Anti-K (monoclonal)
XI	Anticuerpo	Antieritrocítico (policlonal)

Zona indicadora XI es el control (ctl) y contiene anticuerpos policlonales antieritrocíticos. Se localiza dispuesta distalmente a todas las zonas indicadoras restantes.

En la Fig. 8, se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención realizado como ensayo clínico para la examinación de la identidad AB0 de receptor y bolsa de sangre. En el presente ejemplo, el dispositivo está compuesto por una capa de soporte 1, la membrana porosa 2a y 2b presente en dos ejemplares, la almohadilla de absorción 3 y los elementos sellantes 4a y 4b realizados en forma de barra bidimensional. Ambas membranas porosas 2a y 2b están fijadas en paralelo y misma orientación sobre la capa de soporte 1 dotada de un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Igualmente, la almohadilla de absorción 3 está fijada sobre la capa de soporte 1, superponiéndose una parte de la almohadilla de absorción 3 con ambas membranas porosas 2a y 2b por el mismo intervalo. Los elementos sellantes 4a y 4b fijados sobre el lado superior de las membranas porosas 2a y 2b separan las zonas de aplicación 5a y 5b del resto del área de membrana y posibilitan la distribución dirigida de líquido de muestra y reactivos de ensayo en las membranas porosas 2a y 2b. Entre las zonas de aplicación 5a o 5b y las regiones respectivas de las membranas porosas 2a y 2b que están en contacto con la almohadilla de absorción 3, se disponen las regiones de zonas indicadoras 6a y 6b. Estas están formadas por las zonas indicadoras Ia–IIa o Ib–IIb en forma de punto dispuestas diagonalmente escalonadas en posiciones X e Y definidas, estando compuestas las zonas indicadoras por los siguientes elementos de unión:

Zona indicadora	Elemento de unión	Especificación
Ia, Ib	Anticuerpo	Anti-A (monoclonal)
IIa, IIb	Anticuerpo	Anti-B (monoclonal)

IIIa, IIIb

Anticuerpo

Antieritrocíticos (policlona)

Zonas indicadoras IIIa e IIIb son los controles (ctl) y contienen anticuerpos policlonales antieritrocíticos. Se localizan dispuestas distalmente a todas las zonas indicadoras restantes.

5 En la Fig. 9, se muestra una vista en despiece del dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención representado en la Fig. 8, con los componentes capa de soporte 1, membranas porosas 2a y 2b, almohadilla de absorción 3 y los elementos sellantes 4a y 4b que separan, respectivamente, las zonas de aplicación 5a y 5b del resto de la membrana, que a su vez contiene la región de zonas indicadoras 6a o 6b con las zonas indicadoras Ia-IIIa e Ib-IIIb dispuestas diagonalmente escalonadas.

10 En la Fig. 10, se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE. El presente ejemplo representa un dispositivo de ensayos de flujo lateral para diestros y está compuesto por una capa de soporte 1, la membrana porosa 2, la almohadilla de absorción 3 y el elemento sellante 4 realizado en forma de barra bidimensional. A este respecto, la membrana porosa 2 está fijada sobre la capa de soporte 1 dotada de un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Igualmente, la almohadilla de absorción 3 está fijada sobre la capa de soporte 1, superponiéndose una parte de la almohadilla de absorción 3 con la membrana porosa 2. El elemento sellante 4 fijado sobre el lado superior de la membrana porosa 2 separa la zona de aplicación 5 del resto del área de membrana y posibilita la distribución dirigida de líquido de muestra y reactivos de ensayo en la membrana porosa 2. Entre la zona de aplicación 5 y la región de membrana porosa 2 que está en contacto con la almohadilla de absorción 3, se dispone la región de zonas indicadoras 6. Ésta está formada por zonas indicadoras I-VI en forma de punto dispuestas escalonadas lado a lado paralelamente en posiciones X e Y definidas, estando compuestas las zonas indicadoras por los siguientes elementos de unión:

Zona indicadora	Elemento de unión	Especificación
I	Anticuerpo	Anti-A (monoclonal)
II	Anticuerpo	Anti-B (monoclonal)
III	Anticuerpo	Anti-AB (monoclonal)
IV	Anticuerpo	Anti-D (monoclonal)
V	Anticuerpo	Anti-CDE (monoclonal)
VI	Anticuerpo	Antieritrocíticos (policlona)

25 Zona indicadora VI es el control (ctl) y contiene anticuerpos policlonales antieritrocíticos. Se localiza dispuesta distalmente a todas las zonas indicadoras restantes.

30 En la Fig. 11 se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE. El presente ejemplo representa un dispositivo para ensayos de flujo lateral para zurdos y está compuesto por una capa de soporte 1, la membrana porosa 2, la almohadilla de absorción 3 y el elemento sellante 4 realizado en forma de barra bidimensional. A este respecto, la membrana porosa 2 está fijada sobre la capa de soporte 1 dotada de un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Igualmente, la almohadilla de absorción 3 está fijada sobre la capa de soporte 1, superponiéndose una parte de la almohadilla de absorción 3 con la membrana porosa 2. El elemento sellante 4 fijado sobre el lado superior de la membrana porosa 2 separa la zona de aplicación 5 del resto del área de membrana y posibilita la distribución dirigida de líquido de muestra y reactivos de ensayo en la membrana porosa 2. Entre la zona de aplicación 5 y la región de membrana porosa 2 que está en contacto con la almohadilla de absorción 3, se dispone la región de zonas indicadoras 6. Ésta está formada por zonas indicadoras I-VI en forma de punto dispuestas escalonadas lado a lado paralelamente en posiciones X e Y definidas, estando compuestas las zonas indicadoras por los siguientes elementos de unión:

Zona indicadora	Elemento de unión	Especificación
I	Anticuerpo	Anti-A (monoclonal)
II	Anticuerpo	Anti-B (monoclonal)
III	Anticuerpo	Anti-AB (monoclonal)
IV	Anticuerpo	Anti-D (monoclonal)
V	Anticuerpo	Anti-CDE (monoclonal)
VI	Anticuerpo	Antieritrocíticos (policlona)

45 Zona indicadora VI es el control (ctl) y contiene anticuerpos policlonales antieritrocíticos. Se localiza dispuesta distalmente a todas las zonas indicadoras restantes.

50 En la Fig. 12, se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE. El presente ejemplo representa un dispositivo de ensayos de flujo lateral para diestros y está compuesto por una capa de soporte 1, la membrana porosa 2, la almohadilla de absorción 3 y el elemento sellante 4 realizado en forma de barra bidimensional. A este respecto, la membrana porosa 2 está fijada sobre la capa de soporte 1 dotada de un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Igualmente, la almohadilla de absorción 3 está fijada sobre la capa de soporte 1, superponiéndose una parte de la almohadilla de absorción 3 con la membrana porosa 2. El elemento sellante 4 fijado sobre el lado superior de la membrana porosa 2 separa la zona de aplicación 5 del resto del área de membrana y posibilita la distribución dirigida de líquido de muestra y reactivos de ensayo en la membrana porosa 2. Entre la zona de aplicación 5 y la región de membrana porosa 2 que está en contacto con la almohadilla de absorción 3, se dispone la región de zonas indicadoras 6. Ésta está formada por zonas indicadoras I-VI en forma estirada longitudinalmente o de cinta dispuestas escalonadas lado a lado paralelamente en posiciones X e Y definidas, estando compuestas las zonas indicadoras por los siguientes elementos de unión:

Zona indicadora	Elemento de unión	Especificación
I	Anticuerpo	Anti-A (monoclonal)
II	Anticuerpo	Anti-B (monoclonal)
III	Anticuerpo	Anti-AB (monoclonal)
IV	Anticuerpo	Anti-D (monoclonal)
V	Anticuerpo	Anti-CDE (monoclonal)
VI	Anticuerpo	Antieritrocíticos (policlonal)

Zona indicadora VI es el control (ctl) y contiene anticuerpos policlonales antieritrocíticos. Se localiza dispuesta distalmente a todas las zonas indicadoras restantes.

- 5 En la Fig. 13 se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo para ensayos de flujo lateral según la invención para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE. El presente ejemplo representa un dispositivo para ensayos de flujo lateral para zurdos y está compuesto por una capa de soporte 1, la membrana porosa 2, la almohadilla de absorción 3 y el elemento sellante 4 realizado en forma de barra bidimensional. A este respecto, la membrana porosa 2 está fijada sobre la capa de soporte 1 dotada de un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Igualmente, la almohadilla de absorción 3 está fijada sobre la capa de soporte 1, superponiéndose una parte de la almohadilla de absorción 3 con la membrana porosa 2. El elemento sellante 4 fijado sobre el lado superior de la membrana porosa 2 separa la zona de aplicación 5 del resto del área de membrana y posibilita la distribución dirigida de líquido de muestra y reactivos de ensayo en la membrana porosa 2. Entre la zona de aplicación 5 y la región de membrana porosa 2 que está en contacto con la almohadilla de absorción 3, se dispone la región de zonas indicadoras 6. Ésta está formada por zonas indicadoras I-VI en forma estirada longitudinalmente o de cintadispuestas escalonadas lado a lado paralelamente en posiciones X e Y definidas, estando compuestas las zonas indicadoras por los siguientes elementos de unión:

Zona indicadora	Elemento de unión	Especificación
I	Anticuerpo	Anti-A (monoclonal)
II	Anticuerpo	Anti-B (monoclonal)
III	Anticuerpo	Anti-AB (monoclonal)
IV	Anticuerpo	Anti-D (monoclonal)
V	Anticuerpo	Anti-CDE (monoclonal)
VI	Anticuerpo	Antieritrocíticos (policlonal)

- 20 Zona indicadora VI es el control (ctl) y contiene anticuerpos policlonales antieritrocíticos. Se localiza dispuesta distalmente a todas las zonas indicadoras restantes.

- 25 En la Fig. 14 se muestra como ejemplo una vista en perspectiva de un dispositivo para ensayos de flujo lateral con flujo bidireccional según la invención para la determinación simultánea de las características de grupos sanguíneos A, B, AB, D y CDE. En el presente ejemplo el dispositivo está compuesto por una capa de soporte 1, la membrana porosa 2, las almohadillas de absorción 3a y 3b y los elementos sellantes 4a y 4b realizados en forma de barra bidimensional. A este respecto, la membrana porosa 2 está fijada sobre la capa de soporte 1 dotada de un adhesivo de acrilato sensible a la presión. Igualmente, las almohadillas de absorción 3a y 3b están fijadas sobre la capa de soporte 1, superponiéndose una parte de las almohadillas de absorción 3a y 3b con la membrana porosa 2. Los elementos sellantes 4 fijados sobre el lado superior de la membrana porosa 2 separan la zona de aplicación 5 del resto del área de membrana y posibilitan la distribución bidireccional dirigida de líquido de muestra y reactivos de ensayo en la membrana porosa 2. Entre la zona de aplicación 5 y la región de membrana porosa 2 que está en contacto con las almohadillas de absorción 3a y 3b, se disponen las regiones de zonas indicadoras 6a y 6b. Ésta está formada por zonas indicadoras I-VI en forma de punto dispuestas diagonalmente escalonadas en posiciones X e Y definidas, estando compuestas las zonas indicadoras por los siguientes elementos de unión:

Zona indicadora	Elemento de unión	Especificación
I	Anticuerpo	Anti-A (monoclonal)
II	Anticuerpo	Anti-B (monoclonal)
III	Anticuerpo	Anti-AB (monoclonal)
IV	Anticuerpo	Anti-D (monoclonal)
V	Anticuerpo	Anti-CDE (monoclonal)
Vla, VIb	Anticuerpo	Antieritrocíticos (policlonal)

- 40 Las zonas indicadoras VIa y VIb son los controles (ctl) y contienen anticuerpos antieritrocíticos policlonales. Se encuentran dispuestas distalmente a las zonas indicadoras I-III o IV-V.

- 45 En la Fig. 15 se muestra una vista en despiece del dispositivo para ensayos de flujo lateral con flujo bidireccional según la invención representado en la Fig. 14, que está compuesto por los componentes capa de soporte 1, membrana porosa 2, las almohadillas de absorción 3a y 3b y los elementos sellantes 4a y 4b que separan la zona de aplicación 5 que se encuentra en el medio del área de membrana restante, que a su vez contiene dos regiones 6a y 6b de zonas indicadoras con las zonas indicadoras I, II, III, VIa o IV, V, VIb dispuestas diagonalmente escalonadas de manera proximal a distal.

Ejemplos

- 50 **Ejemplo 1: Determinación de grupos sanguíneos**

Preparación de las tiras de ensayo:

Las tiras de ensayo están compuestas por una zona de aplicación, una región de zonas indicadoras y una región de

absorción. Se recortan membranas de clase Millipore HiFlow Plus 065 en tiras de un tamaño de 15 x 35 mm (anchura/longitud; x/y) para un ensayo de 6 puntos o de un tamaño de 26 x 40 mm para un ensayo de 11 puntos y se adhieren a una capa de soporte ("Backing Sheet", por ejemplo de G&L). Se aplican puntos de 0,2 µl dispuestos diagonalmente o alternativamente en serie lineal en la región de las zonas indicadoras de soluciones de distintos anticuerpos monoclonales específicos de grupos sanguíneos usando un dispensador, por ejemplo AD3200 (Biodot):

Clon anti-A Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); clon anti-B ES-4 (Serologicals, NCA0201); clones anti-AB AB6, AB26, AB92 (Medion Diagnostics, 010062); clon anti-D LDM3 (SNBTS, Z7180100); clon anti-C MS-24 (Serologicals, no formulado, KGK0212); clon anti-c MS-33 (Serologicals, KNI0207); clones anti-E MS-80 + MS-258 (Serologicals, KXE0201); clones anti-e MS-21 + MS-63 (Serologicals, KLL0205+KQK0205); clon anti-Cw MS-110 (Serologicals, JPK0201); clon anti-K MS-56 (Serologicals, KOA0201).

La colocación de los anticuerpos anti-A se efectúa en posición $x=3/y=10$ mm. Todos los demás anticuerpos se dispensan iterativamente a distancias de $x=1,5/y=2,2$ mm de la posición del anticuerpo anti-A. El anticuerpo de control específico antieritrocíticos ("Rabbit IgG Fraction of anti Human RBC", Rockland, 209-4139) se aplican con un desplazamiento de $x=2/y=3,5$ mm con respecto al último punto de la serie de los anticuerpos específicos de grupos sanguíneos. Las diluciones de anticuerpo se efectúan en tampón fosfato de potasio 15 mM, pH 7,5, 10 % (v/v) de metanol) del modo siguiente: anticuerpo anti-A 1:3, anticuerpo anti-B 1:2, anticuerpo anti-AB 1:4, anticuerpo anti-D 1:4, anticuerpo anti-RBC 1:3. Todas las otras disoluciones de anticuerpos no se diluyen previamente, no obstante, se añade metanol al 10 % (p/p).

Después de la dispensación de los elementos de unión, se secan las membranas durante 20 min a 40°C y a continuación se mantienen a humedad ambiental constante hasta llevar a cabo el ensayo. En el extremo distal de la zona de aplicación, se adhiere una almohadilla de absorción de 15 x 10 mm ó 26 x 10 mm de tamaño (Schleicher & Schüll, 300) superpuesta 3 mm con la membrana. Se separa la zona de aplicación del resto de la membrana mediante la adhesión de una tira adhesiva de 1-2 mm de ancho (Tesa 4124) en posición $y=5$ mm a lo largo de toda la anchura de la membrana.

Receta de ensayo:

Como muestras de sangre se usa sangre completa anticoagulada. Para el ensayo mismo, se aplican a la zona de aplicación 100 µl de sangre diluida en tampón de dilución 1:6 (Enlisstll, Medion Diagnostics o diluyente 1, DiaMed) (ensayo de 6 puntos) ó 150 µl (ensayo de 11 puntos). Cuando la sangre ha dejado la zona de aplicación, se pipetea a la zona de aplicación una vez 100 µl ó 150 µl de tampón de dilución o preferentemente 100 µl de tampón de lavado hipoosmótico (tampón de fosfato de potasio 15 mM, pH 7,4, 0,3-0,45 % (p/v) NaCl) para eliminar los eritrocitos no unidos. No obstante, alternativamente puede efectuarse la aplicación de la muestra también con 50 µl de sangre no diluida o diluida 1:3. En estas muestras, la membrana se lava dos veces con tampón de dilución o una vez con tampón de dilución y seguidamente con tampón de lavado hipoosmótico.

En el caso de la dilución 1.6 elegida, el control anti-RBC como indicador de un ensayo llevado a cabo con éxito es visible después de 2 minutos. Con sangre no diluida, el ensayo dura más.

Resultado:

El ensayo es válido cuando los controles anti-RBC muestran una señal claramente positiva (punto rojo). Según la presencia o ausencia de los respectivos antígenos de grupos sanguíneos, aparecen en las posiciones correspondientes puntos rojos (positivo) o la coloración de fondo casi blanca de la membrana (negativo).

Ejemplo 2: Ensayo clínico

Preparación de las tiras de ensayo:

El ensayo clínico consiste en dos membranas respectivas ("bolsa de sangre", "receptor") fijadas sobre una capa portadora ("Backing Sheet") que están constituidas respectivamente por una zona de aplicación, una región de zonas indicadoras y una región de absorción.

Se recortan membranas de clase Millipore HiFlow Plus 065 en tiras de un tamaño de 12,5 mm x 30 mm (anchura/longitud; x/y). Se adhieren en cada caso dos de ellas sobre una capa soporte ("Backing Sheet", por ejemplo de G&L) a una distancia de 5 mm, de tal modo que el ensamble total tenga un tamaño de 30 x 30 mm.

Se disponen diagonalmente sobre ambas membranas usando un dispensador, por ejemplo AD3200 (Biodot) los siguientes, en cada caso con la misma aplicación: puntos de 0,2 µl de soluciones de anticuerpos monoclonales clon anti-A Birma-1 (Serologicals, TLJ0105) en posición $x=4/y=12$ mm; clon anti-B ES-4 (Serologicals, NCA0201) en posición $x=7/y=14$ mm. El anticuerpo control específico antieritrocítico ("Rabbit IgG Fraction of anti Human RBC", Rockland, 209-4139) se aplica a una distancia $x=3/y=4$ mm del punto anti-B. Las diluciones del anticuerpo se efectúan en tampón fosfato de potasio 15 mM, pH 7,5, 10 % (v/v) de metanol) del modo siguiente: anticuerpo anti-A 1:3, anticuerpo anti-B 1:2, anticuerpos anti-RBC 1:3.

Después de la dispensación de los elementos de unión, se secan las membranas durante 20 min a 40°C y a continuación se mantienen a humedad ambiental constante hasta la práctica del ensayo. En ambos extremos distales de la zona de aplicación, se adhiere una almohadilla de absorción de 30x10 mm de tamaño (Schleicher & Schüll, 300) superpuesta 3 mm con la membrana. Se separa la zona de aplicación del resto de la membrana mediante la adhesión de una tira adhesiva de 1-2 mm de ancho (Tesa 4124) en posición $y=5$ mm a lo largo de toda la anchura de la membrana.

Receta de ensayo:

Como muestras se usan: Para la membrana “conserva”: concentrado de eritrocitos; para la membrana “receptor”: sangre completa.

- 5 Para el ensayo mismo se aplican 50 µl de sangre entera al lado “receptor” y 50 µl de concentrado de eritrocitos al lado “bolsa de sangre” en las respectivas zonas de aplicación. Después de que la sangre haya sido absorbida completamente de la membrana, se lava respectivamente con 2 x 100 µl de tampón de dilución o una vez con tampón de dilución y seguidamente con tampón de lavado hipoosmótico.

10 Resultado:

El control anti-RBC como indicador de un ensayo llevado a cabo con éxito se hace visible en el caso de ambas membranas después de aproximadamente 2 minutos.

- 15 El ensayo es válido cuando el control anti-RBC muestra una señal claramente positiva (punto rojo). Según la presencia o ausencia de los respectivos antígenos de grupos sanguíneos, aparecen en las posiciones correspondientes puntos rojos (positivo) o la coloración de fondo casi blanca de la membrana (negativo). Un cuadro idéntico para “receptor” y “bolsa de sangre” significa identidad ABO entre receptor y bolsa de sangre.

20 **Ejemplo 3:** Determinación de grupos sanguíneos con ensayo de flujo lateral bidireccional

Preparación de las tiras de ensayo:

- 25 Las tiras de ensayo están constituidas por una zona de aplicación que se encuentra en el medio de la membrana, dos regiones de zonas indicadoras y dos regiones de absorción. Se recortan membranas de clase Millipore HiFlow Plus 065 en tiras de un tamaño de 15 mm x 50 mm (anchura/longitud, x/y) y se adhieren sobre una capa soporte (“Backing Sheet”, por ejemplo de G&L). Se aplican puntos de 0,2 µl dispuestos diagonalmente o alternativamente en serie lineal en la región de las zonas indicadoras de soluciones de distintos anticuerpos monoclonales específicos de grupos sanguíneos. A este respecto, el punto medio de la longitud de la tira (y=0 mm) es la magnitud de referencia para la colocación de las zonas indicadoras en la dirección y. Los siguientes anticuerpos se dispensan usando un dispensador, por ejemplo, AD3200 (Biodot):

- 30 clon anti-A Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); clon anti-B ES-4 (Serologicals, NCA0201); clones anti-AB AB6, AB26, AB92 (Medion Diagnostics, 010062); clon anti-D LDM3 (SNBTS, Z71 80100); clon anti-C MS-24 (Serologicals, no formulado, KGK0212); clones anti-E MS-80 + MS-258 (Serologicals, KXE0201). Para la zona indicadora CDE se concentran los anticuerpos anti-D y anti-C dos veces, los anticuerpos anti-E tres veces y se mezclan en las mismas partes en volumen.

- 40 En la forma de realización de la disposición diagonal de las zonas indicadoras, el anticuerpo anti-A se dispensa en posición x=4/y=10 mm. Las colocaciones de los anticuerpos anti-B y anti-AB se efectúan iterativamente a distancias de x=3,5/y=2 mm de la posición del anticuerpos anti-A. El anticuerpo de control específico antieritrocíticos („Rabbit IgG Fraction of anti Human RBC, Rockland, 209-4139) se aplica a una distancia x=3,5/y=3,5 mm del último punto de la serie de los anticuerpos anti-A, anti-B y anti-AB. El anticuerpo anti-D se dispensa en posición x=4/y=-10 mm, el anticuerpo anti-CDE se dispensa a una distancia de x=3,5/y=-2 mm. El anticuerpo de control específico antieritrocítico se aplica a una distancia x=3,5/y=-3,5 mm del punto del anticuerpo anti-CDE. Las diluciones de anticuerpo se efectúan en tampón fosfato de potasio 15 mM, pH 7,5, 10 % (v/v) de metanol) del modo siguiente: anticuerpo anti-A 1:3, anticuerpo anti-B 1:2, anticuerpo anti-AB 1:4, anticuerpo anti-D 1:3, anticuerpo anti-RBC 1:3. La mezcla de anticuerpos anti-CDE no se diluye previamente, no obstante, se añade metanol al 10 % (p/p).

- 50 Después de la dispensación de los elementos de unión, se secan las membranas durante 20 min a 40°C y a continuación se mantienen a humedad ambiental constante hasta la práctica del ensayo. En el extremo distal a la zona de aplicación, se adhiere una almohadilla de absorción de 15x10 mm de tamaño (Schleicher Schüll, 300) superpuesta 3 mm con la membrana. Se separa la zona de aplicación del resto de la membrana mediante la adhesión de una tira adhesiva de 1–2 mm de ancho (Tesa 4124) en posición y=3 mm o y=-3 mm a lo largo de toda la anchura de la membrana.

55 Receta de ensayo:

- 60 Como muestras de sangre se usa sangre completa anticoagulada. Para el ensayo mismo, se aplican a la zona de aplicación 100 µl de sangre diluida en tampón de dilución 1:6 (EnlisstII, Medion Diagnostics). Cuando la sangre ha dejado la zona de aplicación, se pipetea a la zona de aplicación una vez 100 µl de tampón de dilución o 100 µl de tampón de lavado hipoosmótico (tampón de fosfato de potasio 15 mM, pH 7,4, 0,3-0,45 % (p/v) NaCl) para lavar los eritrocitos no unidos de la membrana. No obstante, alternativamente también puede efectuarse la aplicación de la muestra con 50 µl de sangre no diluida o diluida 1:3. En estas muestras, la membrana se lava dos veces con tampón de dilución o una vez con tampón de dilución y seguidamente con tampón de lavado hipoosmótico.

- 65 En el caso de la dilución 1.6 elegida, el control anti-RBC como indicador de un ensayo llevado a cabo con éxito es visible después de 2 minutos. Con sangre no diluida, el ensayo dura más.

70 Resultado:

El ensayo es válido cuando los controles anti-RBC muestran una señal claramente positiva (punto rojo). Según la presencia o ausencia de los respectivos antígenos de grupos sanguíneos, aparecen en las posiciones correspondientes puntos rojos (positivo) o la coloración de fondo casi blanca de la membrana (negativo).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo para la determinación cualitativa o cuantitativa simultánea de varios analitos en una muestra líquida, siendo los analitos antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos, que comprende una membrana (2) con
- 10 - una zona de aplicación (5) para la aplicación de la muestra líquida,
 - al menos dos zonas indicadoras que pueden interactuar con el analito o los analitos y
 - al menos una región de absorción (3), que absorbe el líquido después de pasar por las zonas indicadoras,
- 15 encontrándose las zonas indicadoras entre la zona de aplicación (5) y una región de absorción (3), **caracterizado porque** las direcciones de flujo desde la zona de aplicación (5) a través de las zonas indicadoras respectivas hasta una región de absorción (6) (trayectorias de flujo) son esencialmente paralelas y se presentan al menos dos trayectorias de flujo distintas, estando dispuestas las zonas indicadoras de modo que el líquido de muestra no cruza más de una zona indicadora por trayectoria de flujo, y las zonas indicadoras comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos y/o lectinas o fragmentos de las mismas contra antígenos de grupos sanguíneos.
- 20 2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que las zonas indicadoras están dispuestas en una serie diagonal, en forma de V, W, M, N o lineal.
- 25 3. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que las zonas indicadoras comprenden en particular anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-A, -B, -AB, -D, -C, -c, -E, -e, -Cw y/o -K.
- 30 4. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la membrana (2) está preferiblemente compuesta por polietileno, nitrocelulosa o nailon.
- 35 5. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que detrás de la zona de aplicación (5) y delante de las zonas indicadoras está dispuesto al menos un elemento sellante (4) sobre la membrana (2).
- 40 6. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los componentes del dispositivo están aplicados sobre una capa de soporte (1) para el reforzamiento mecánico.
- 45 7. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los componentes del dispositivo están integrados en una carcasa.
- 50 8. Uso del dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 7 para el análisis de sangre, en particular para la determinación simultánea de los antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos A, B, AB, D, C, c, E, e, Cw y/o K.
- 55 9. Procedimiento para la determinación de varios analitos o sus derivados en una muestra líquida, en el que los analitos son antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos, que comprende:
- 60 la aplicación de la muestra sobre la zona de aplicación (5) de una membrana (2) del dispositivo según una de las reivindicaciones precedentes 1 a 8, en el que esta muestra se presenta en suficiente cantidad para inducir que el líquido de muestra fluya en dirección de la región de absorción (3) a través de las zonas indicadoras, y para inducir que los analitos o sus derivados en el líquido de muestra formen un complejo en las zonas indicadoras.
- 65 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que los analitos comprenden en particular antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos A, B, AB, D, C, c, E, e, Cw y/o K.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 10, en el que se determinan simultáneamente los analitos antígenos o epítomos de antígenos de grupos sanguíneos A, B, AB, D, C, c, E, e, Cw y/o K.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 11, en el que las partículas indicadoras son eritrocitos.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la membrana (2) se lava después de aplicar las partículas indicadoras.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el tampón de lavado es preferentemente hipoosmótico.3
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 14, en el que la muestra líquida consiste en sangre o componentes de sangre, preferentemente en sangre completa, concentrado de eritrocitos o líquido de ensayo, tal como sangre de control.

FIG. 1

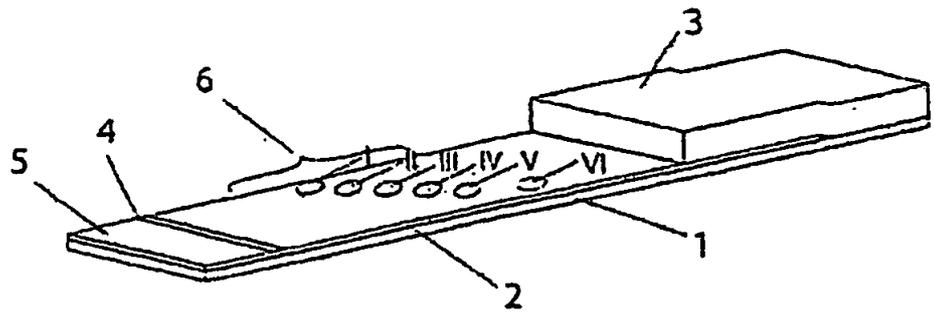


FIG. 2

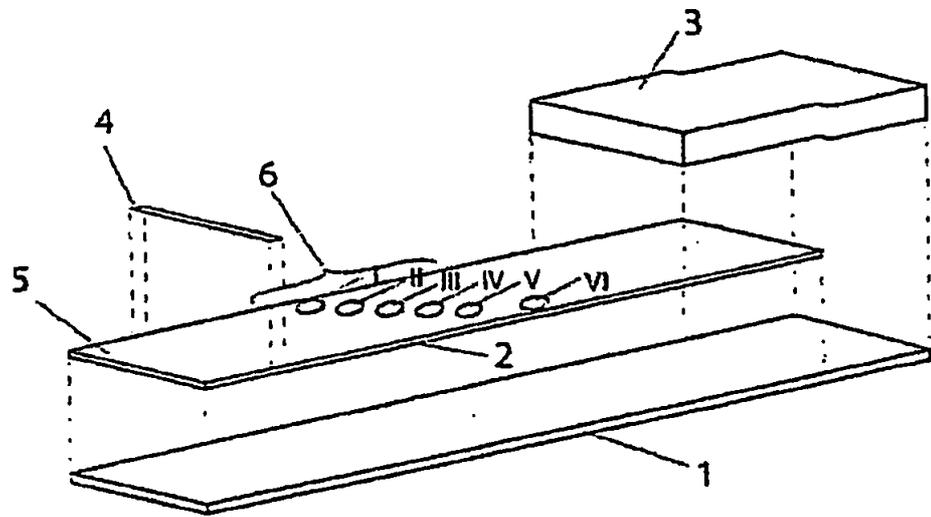


FIG. 3

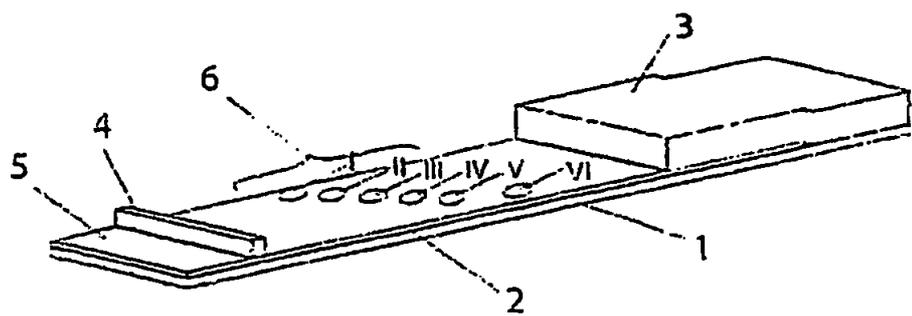


FIG. 4

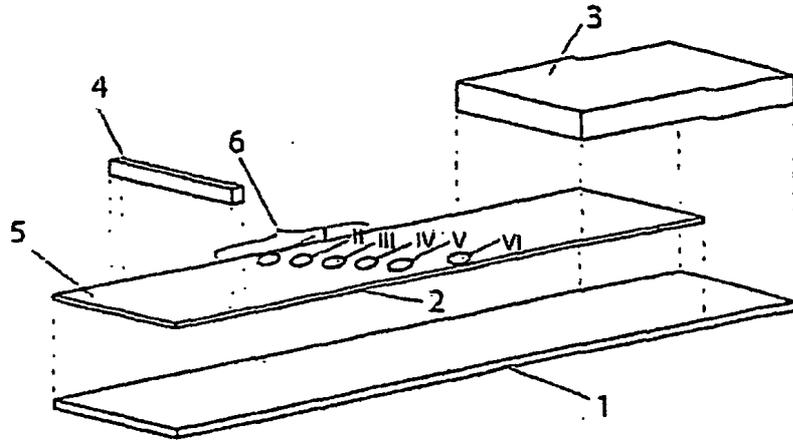


FIG. 5

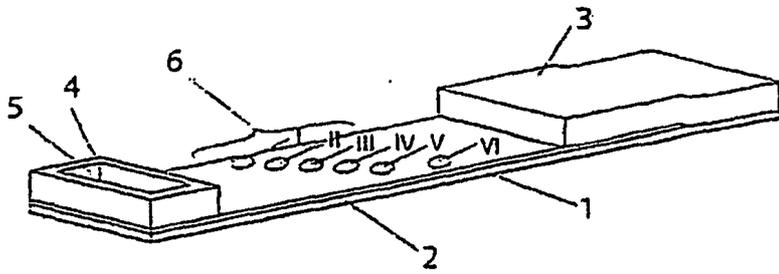


FIG. 6

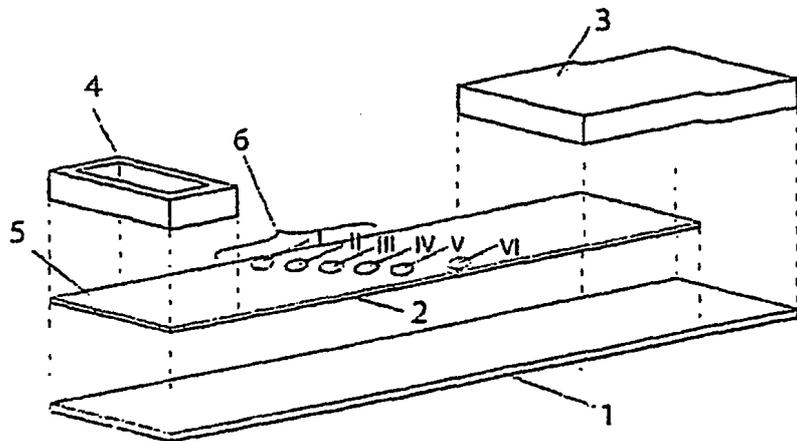


FIG. 7

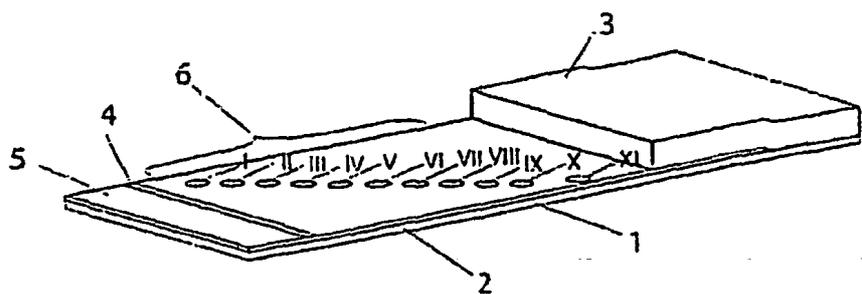


FIG. 8

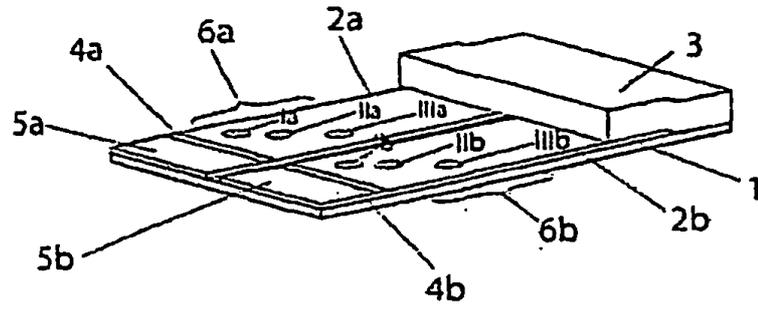


FIG. 9

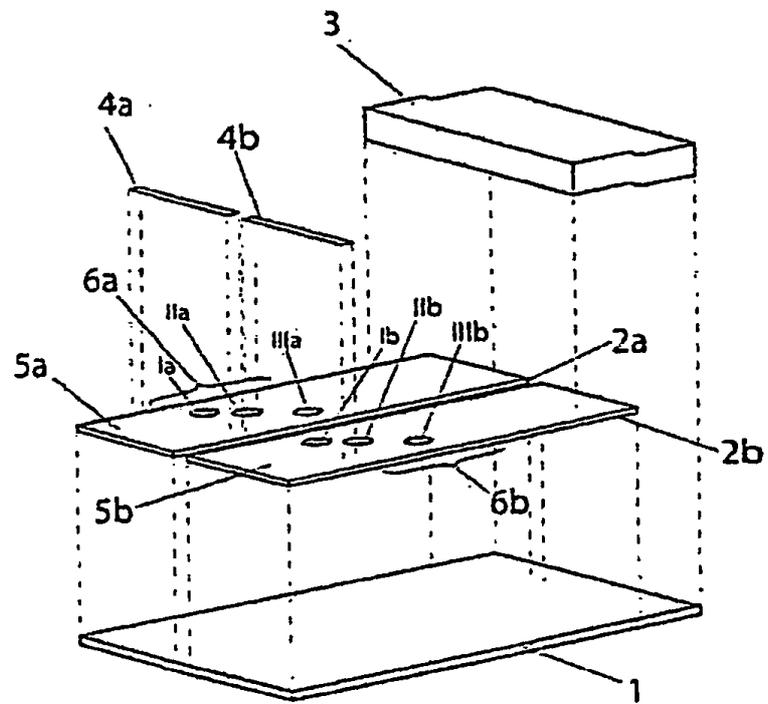


FIG. 10

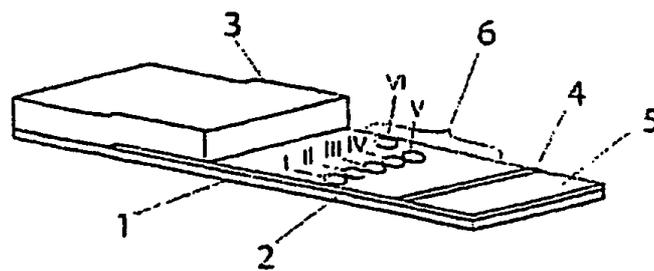


FIG. 11

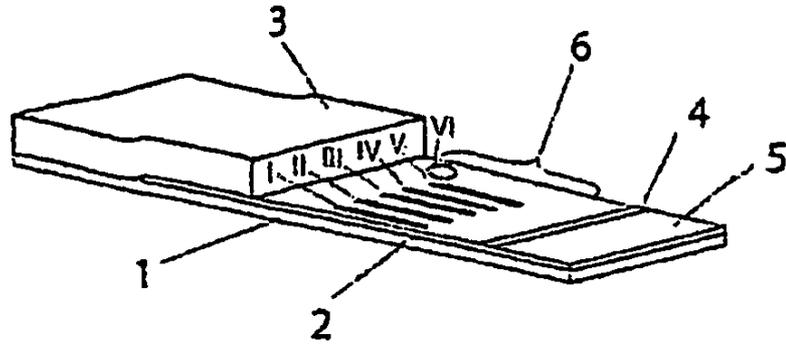


FIG. 12

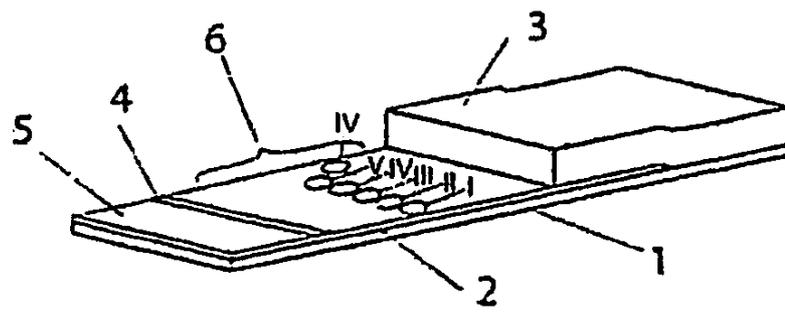


FIG. 13

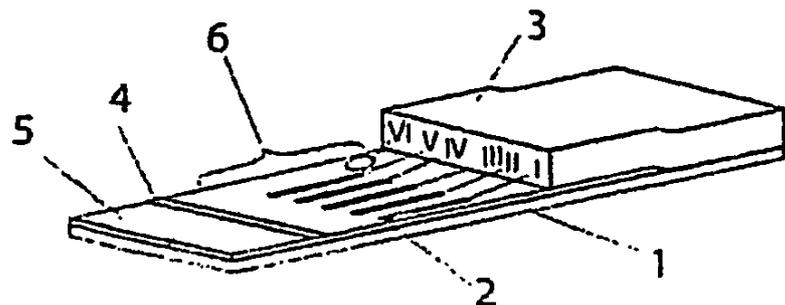


FIG. 14

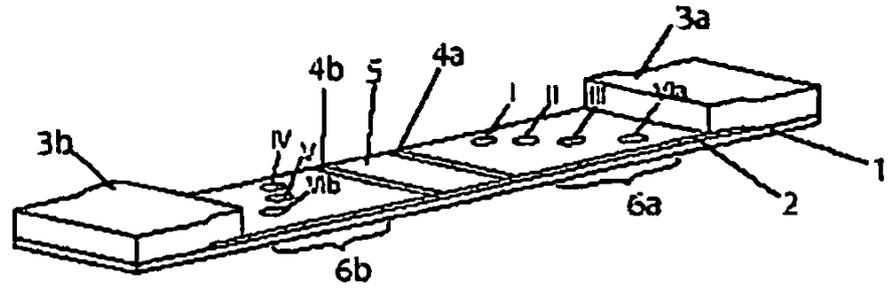


FIG. 15

