

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 972**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/80 (2006.01)

B01D 67/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2013** **PCT/FR2013/051358**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013** **WO13186482**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2013** **E 13744587 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** **EP 2859344**

54 Título: **Dispositivo de diagnóstico in vitro y utilizaciones**

30 Prioridad:

11.06.2012 FR 1255452

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

17.09.2018

73 Titular/es:

DIAGAST (100.0%)
Eurasanté Parc, 251, avenue Eugène Avinée
59120 Loos, FR

72 Inventor/es:

CHAIBI, NAJIM;
MALGOURIES, SYLVAIN y
LUCAS, MEGUMI

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 681 972 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 de diagnóstico *in vitro* y utilidades.

5 La presente invención se refiere a un dispositivo de diagnóstico *in vitro*, a partir de una muestra de sangre o de uno de sus componentes, para detectar reacciones entre antígenos eritrocitarios y anticuerpos dirigidos específicamente contra estos antígenos.

10 La invención tiene también como objeto las utilidades de este dispositivo para la identificación y la determinación de grupos sanguíneos.

15 Los diagnósticos inmuno-hematológicos tienen como objetivo prevenir o diagnosticar un ataque de glóbulos rojos por unos anticuerpos. Para ello, es necesario disponer de herramientas que permitan determinar los antígenos presentes en la superficie de los glóbulos rojos, permitiendo su presencia o su ausencia definir el grupo sanguíneo, pero también identificar si una sangre contiene uno o varios anticuerpos dirigidos contra los antígenos conocidos de los glóbulos rojos, indicando la presencia de un anticuerpo la posibilidad de una incompatibilidad.

20 Las técnicas utilizadas habitualmente consisten, por lo tanto, en buscar e identificar la presencia o la ausencia de antígeno de grupo sanguíneo en la superficie de los eritrocitos y/o en buscar e identificar la presencia o la ausencia de anticuerpos anti-antígenos de grupo sanguíneo en el plasma.

25 Por ejemplo, para el sistema ABO, la prueba de Beth-Vincent permite determinar los antígenos llevados por los glóbulos rojos, y la prueba complementaria de Simonin-Muchon o contra prueba sérica, permite determinar los anticuerpos que circulan en el suero.

30 En la prueba de Beth-Vincent, los glóbulos rojos del individuo se ponen en presencia de reactivos de anticuerpos de especificidad conocida. Generalmente este ensayo se hace visible mediante la observación de la aglutinación de los glóbulos rojos cuando los anticuerpos reconocen los antígenos eritrocitarios correspondientes.

En la prueba de Simonin, el plasma del individuo se pone en presencia de glóbulos rojos de ensayos, que pertenecen cada uno a un grupo antigénico preciso del sistema ABO. Se trata de un ensayo de aglutinación de hemáties de ensayo con el plasma del individuo.

35 Para la búsqueda de anticuerpos denominados irregulares, se trata de detectar la presencia o la ausencia en la sangre de un individuo de inmunoglobulinas dirigidas contra diversos antígenos eritrocitarios. En el caso de una búsqueda de auto-anticuerpos, se buscan directamente los anticuerpos ya fijados *in vivo* en el individuo en el ensayo directo. En el caso de una búsqueda de alo-anticuerpos, se busca poner en evidencia la fijación de estas inmunoglobulinas sobre unos glóbulos rojos de ensayo cuyos antígenos son conocidos, con la técnica de Coombs indirecta.

40 Existe un gran número de procedimientos y de dispositivos utilizados para el fenotipaje en el campo de la inmuno-hematología (por ejemplo el procedimiento descrito en la solicitud FR 2 892 820 que consiste en la utilización de bolas magnéticas), pero las técnicas existentes de fenotipaje de grupos sanguíneos presentan numerosos inconvenientes.

45 Las técnicas de microplaca, por ejemplo, necesitan una fase de centrifugación seguida de una etapa de agitación. La etapa de agitación es crítica ya que las múltiples reacciones simultáneamente presentes en el soporte no tienen la misma cinética de resuspensión. Se tiene el riesgo de deshacer débiles aglutinaciones sin llegar a resuspender fuertes aglutinaciones. Se deben realizar bajo control visual y se necesita estar particularmente atento a los fenómenos de adherencia de algunos reactivos.

50 Asimismo, durante la realización de técnicas de filtración por gel de ensayo, existe también un riesgo de no detección de algunas aglutinaciones, en particular durante la prueba plasmática del grupo ABO a causa de la disociación por cizallamiento de pequeños aglutinados durante su paso en el gel.

55 Además, todas estas técnicas presentan un inconveniente principal debido a que necesitan una etapa de centrifugación para decantar los glóbulos rojos o hacerlos pasar a través del gel, etapa restrictiva que aumenta en gran medida el tiempo y el coste de análisis, y que necesita la utilización de centrifugadoras voluminosas y difíciles de manipular.

60 Se conoce también el método de inmunofiltración, tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud EP 2 167 967, que consiste en capturar un analito presente en una muestra durante su paso a través de una membrana porosa que lleva un elemento de captura y en revelar su presencia por un elemento de revelación. Este tipo de dispositivo está constituido por una zona de depósito de la muestra, por una membrana porosa hidrófila en la que se deposita un reactivo de captura y bajo la cual se dispone una membrana absorbente. La

realización de tal ensayo consiste en depositar una muestra pura o diluida en la zona de depósito de la muestra, que atraviesa la membrana porosa para terminar en la membrana absorbente. Durante este recorrido por capilaridad en la membrana porosa, si el analito que corresponde al elemento de captura está presente en la muestra, éste es inmovilizado por el agente de captura. En una segunda etapa, es necesario revelar la presencia sobre el punto de captura del analito buscado con la ayuda de un agente de revelación capaz de detectar la presencia del analito sobre la zona de captura y que tiene un elemento que le permite ser detectado visualmente (producto coloreado) o revelado mediante un método físico o químico.

Sin embargo, este método presenta problemas de sensibilidad y de especificidad importantes, ya que cuando la muestra se deposita, se difunde e impregna la membrana porosa, y numerosos analitos se pierden en el volumen muerto de la membrana porosa o pasan fuera de la zona de captura. Este es también el caso para la solución de revelación. Por lo tanto, es necesario sobredimensionar el sistema de absorción para poder depositar volúmenes mayores de muestras a ensayar y de solución de revelación, lo que impide la realización de ensayos miniaturizables, de los que se controla la cinética, exenta de recibir agentes de revelación y utilizables en un robot pipeteador.

Para intentar resolver este problema y concentrar la señal, se ha propuesto en la solicitud CA 1 312 265 o WO 02052263, interponer encima y debajo de la membrana porosa hidrófila, una estructura hidrófoba perforada para forzar al flujo a pasar por el punto de captura. Sin embargo, con estos dispositivos, existe todavía un problema de difusión centrífuga a partir del punto, y los elementos de revelación que pasan por el punto de captura y que no están fijados al mismo se podrán difundir de manera centrífuga en la membrana porosa hidrófila y almacenar en la periferia del punto. Los elementos de revelación escaparán entonces del aclarado, también focalizado sobre el punto. Existe entonces un fenómeno de recuperación de este elemento de revelación en forma de un retorno por difusión centripeta hacia el punto, lo que provoca una recoloración del punto incluso en el caso de ausencia del analito buscado. Este fenómeno impide muy rápidamente leer el ensayo (generalmente entre 5 y 15 minutos) ya que hay aparición de resultados falsamente positivos. Esto es muy problemático, ya que estos dispositivos no permiten reinterpretar posteriormente el dispositivo en caso de duda, de error humano o de pérdida de información.

Otra problemática principal de los dispositivos de inmunofiltración que existen actualmente es el control de la velocidad de paso y, en algunos casos, del tiempo de preincubación. Estos tiempos son importantes ya que la interacción entre el elemento de captura y el analito, así como entre el analito y el elemento de revelación, posee una cierta cinética. Esta cinética describe el número de interacciones realizadas en función del tiempo. Así, en función de las parejas agente de captura/analito y agente de revelación/analito, se necesita poder garantizar un número suficiente de interacciones para cada una de las parejas para obtener una señal suficiente. En el caso en el que la interacción agente de captura/analito es más lenta, se necesita poder regular la velocidad de paso de la muestra a través de la membrana en consecuencia. En el caso en el que la interacción entre el elemento de revelación y el analito sea limitante, es necesario proceder a un tiempo de preincubación en el que el elemento de revelación y el analito se mezclen encima del punto de captura. Sin un sistema particular, el paso a través de una membrana hidrófila es rápido (500 µl/min).

Para controlar el flujo, se ha propuesto la utilización de un pistón, en particular en la solicitud US 2008318342.

Para controlar el tiempo de preincubación, se ha propuesto, en la solicitud WO 03016902 la utilización de un dispositivo en dos partes: una parte superior que comprende una zona de recogida de muestra y una membrana porosa, y una parte inferior que comprende una membrana porosa y una membrana absorbente. En la posición inicial, estos dos bloques no se comunican, y el fluido no puede atravesar por capilaridad. Después de una manipulación mecánica, las dos zonas están en contacto y el fluido puede fluir por capilaridad. Se ha propuesto también depositar el elemento de captura sobre una membrana hidrófoba y activar el paso mediante la adición de un tensioactivo.

Los enfoques mecánicos son difícilmente realizables con un robot ya que necesitan el desarrollo y la utilización de sistemas asignados. Exponen también a los profesionales a eventuales proyecciones durante la manipulación.

La adición de un tensioactivo en el momento de la realización del ensayo para iniciar el sistema es muy perjudicial ya que interfiere fuertemente en las interacciones agentes de captura/analitos. Además, en el caso específico de la inmunohematología, los glóbulos rojos utilizados como agente de revelación no son compatibles con los tensioactivos en forma líquida, ya que la membrana de los glóbulos rojos está disuelta y se vacía de su hemoglobina.

Otro método, descrito en el documento EP 0 334 015, consiste en utilizar una membrana suplementaria subyacente a la primera para controlar el flujo, pero el dispositivo propuesto no permite resolver los problemas relacionados con la difusión de la muestra y del elemento de revelación en la membrana porosa hidrófila. Los ensayos de diagnóstico inmuno-hematológicos existentes presentan, por lo tanto, numerosos inconvenientes.

Otro método, también descrito en el documento EP 0 408 378, comprende la utilización de una membrana hidrófoba cuyas superficies se vuelven totalmente hidrófilas. Sin embargo, esta zona de reacción hidrófila no delimitada específicamente no permite utilizar volúmenes más bajos de reactivos depositados sobre dicha zona de reacción.

Asimismo, la presente invención tiene como objetivo paliar los inconvenientes de la técnica anterior proponiendo un dispositivo adecuado para el diagnóstico inmuno-hematológico *in vitro* por capilaridad fiable, rápido, móvil y económico, simple de fabricación y de utilización, que se pueda miniaturizar y automatizar, y que presente una gran sensibilidad.

Para responder a este objetivo, la presente invención propone un dispositivo de diagnóstico *in vitro* para la detección, a partir de una muestra de sangre o de uno de sus componentes, de por lo menos una reacción entre un antígeno de fenotipo eritrocitario y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno, caracterizado por que comprende:

- un soporte, y
- una membrana porosa hidrófoba de grosor comprendido entre 0,05 mm y 1,5 mm y cuyo diámetro de los poros está comprendido entre 2 y 30 μm , comprendiendo dicha membrana por lo menos una zona de reacción hidrófila destinada a recibir dicha muestra, teniendo dicha zona de reacción una superficie inferior a la superficie de la membrana porosa hidrófoba.

La invención tiene también como objetivo la utilización de este dispositivo, en particular procedimientos de fenotipaje de grupos sanguíneos eritrocitarios y de detección de anticuerpos utilizando este dispositivo.

Ventajosamente, la presente invención permite remediar el conjunto de los inconvenientes encontrados en los ensayos de inmunofiltración que existen actualmente, en particular permitiendo:

- evitar los aumentos de agente de revelación responsables de los falsos positivos
- una sensibilidad incrementada utilizando volúmenes más bajos
- una miniaturización y una automatización del sistema
- un control de la cinética de las reacciones sin necesidad de manipulación mecánica del dispositivo.

Otras características y ventajas aparecerán a partir de la descripción siguiente de la invención, descripción dada a título de ejemplo únicamente, con respecto a los dibujos anexos, en los que:

- la figura 1 representa un esquema de un modo particular de realización del dispositivo según la invención, visto en perspectiva,
- la figura 2A representa la membrana porosa hidrófoba y la membrana absorbente del dispositivo según la invención con una primera variante de las zonas de reacción hidrófilas,
- la figura 2B representa la membrana porosa hidrófoba del dispositivo según la invención con una segunda variante de las zonas de reacción hidrófilas,
- la figura 3A representa un esquema de una sección del dispositivo según la invención, con una membrana porosa hidrófoba que corresponde a la variante representada en la figura 2A,
- la figura 3B representa un esquema de una sección del dispositivo según la invención con una membrana porosa hidrófoba que corresponde a la variante representada en la figura 2B,
- la figura 4A representa los resultados obtenidos después de la utilización del dispositivo según la invención, en una zona de reacción de la membrana porosa hidrófoba representada en la figura 2A y la parte de la membrana absorbente subyacente, y
- la figura 4B representa los resultados obtenidos después de la utilización del dispositivo según la invención, en una zona de reacción de la membrana porosa hidrófoba representada en la figura 2B.

El dispositivo 10 según la invención es un dispositivo de diagnóstico *in vitro* para la detección, a partir de una muestra de sangre o de uno de sus componentes, de por lo menos una reacción entre un antígeno de fenotipo eritrocitario y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno.

Se trata de un dispositivo para el diagnóstico *in vitro* por capilaridad. Es particularmente adecuado para el diagnóstico inmuno-hematológico *in vitro*.

Por antígeno de fenotipo eritrocitario o antígeno de grupo eritrocitario o antígeno de grupo sanguíneo, se

entiende el conjunto de las moléculas inmunogénicas presentes en la superficie de los glóbulos rojos que pueden inducir, llegado el caso, a la producción de anticuerpos dirigidos contra éste y/o permitir el reconocimiento, y después la destrucción de los glóbulos rojos por el sistema inmunitario.

- 5 La reacción entre un antígeno de fenotipo eritrocitario y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno se denomina reacción antígeno-anticuerpo en el resto de la descripción.

10 Por muestra de sangre o de uno de sus componentes, se entiende la sangre total o uno de sus componentes seleccionados en particular entre la fracción de glóbulos rojos, la fracción de glóbulos blancos, el plasma o el suero.

Como se representa en la figura 1, el dispositivo 10 según la invención comprende:

- 15 - un soporte 12, y
- una membrana porosa 14 hidrófoba que comprende por lo menos una zona de reacción 16 hidrófila destinada a recibir la muestra a ensayar.

20 La membrana porosa 14 tiene un grosor comprendido entre 0,05 mm y 1,5 mm, preferentemente entre 0,1 y 1 mm, aún más preferentemente entre 0,4 y 0,8 mm.

El diámetro de los poros está comprendido entre 2 y 30 μm , preferentemente entre 7 y 12 μm .

25 La membrana porosa hidrófoba 14 puede estar constituida por cualquier materia que no esté alterada por los disolventes acuosos. Esta materia se puede seleccionar, en particular, entre unos polímeros naturales modificados químicamente o no, como por ejemplo el polímero de nitrocelulosa, la celulosa o entre unos polímeros sintéticos como, por ejemplo, el polietileno, el polietileno de alta densidad (HDPE) o los polímeros fluorados tal como el PVDF. Esta materia debe ser inicialmente hidrófoba o volverse hidrófoba mediante un tratamiento adecuado. Estos polímeros pueden ser o no funcionalizados con unos grupos reactivos capaces de
30 crear enlaces con los agentes de captura utilizados posteriormente. La membrana porosa hidrófoba 14 comprende por lo menos una zona de reacción 16 hidrófila. La zona de reacción 16 tiene una superficie inferior a la superficie de la membrana porosa hidrófoba 14, es decir que la membrana 14 no se puede hidrofilar totalmente.

35 La o las zonas de reacción hidrófilas 16 de la membrana porosa 14 se han vuelto preferentemente hidrófilas por la adición de un detergente localmente, sin modificación de las funciones químicas del sustrato poroso mediante un tratamiento químico o físico previo de la membrana porosa hidrófoba 14.

40 Por detergente, se entiende cualquier agente hidrofiliante, es decir cualquier sustancia capaz de volver hidrófila la membrana hidrófoba 14.

El detergente utilizado se puede seleccionar entre los detergentes naturales, naturales modificados químicamente u obtenidos por síntesis química. Preferentemente, se trata de un tensioactivo no iónico, por ejemplo el Triton X-100, el Tween 20 o la saponina.

45 El detergente se puede diluir en una solución acuosa o un disolvente orgánico como el etanol, a una concentración comprendida entre el 0,01 y el 5%. Preferentemente, el detergente utilizado para hacer que la membrana 14 sea hidrófila localmente se utiliza a una dosis comprendida entre el 0,01 y el 2% (peso/volumen).

50 La cantidad de detergente utilizada, correlacionada con las otras características de la membrana (porosidad y grosor en particular) permite controlar la velocidad de paso de los fluidos que atraviesan la membrana. Generalmente, se admite que no se debe superar una dosis máxima del 0,1% para el Triton X-100 y 0,05% para el Tween para hacer hidrófila una membrana destinada a recibir un elemento de captura. Ahora bien, debido a unas características particulares de la membrana 14 según la invención, los detergentes capaces de hacer que
55 esta membrana sea hidrófila localmente se pueden utilizar hasta el 2%, en particular para el Triton X-100 y el Tween-20, sin perturbar la reactividad de la zona, lo que facilita la hidrofiliación de la membrana 14.

Una misma membrana hidrófoba 14 puede comprender varias zonas de reacciones hidrófilas 16, con la condición de que estas zonas no coincidan.

60 Las zonas de reacción 16 se pueden presentar en cualquier forma geométrica, pero preferentemente en forma de círculos o puntos de diámetro comprendido entre 0,3 mm y 20 mm.

La zona de reacción 16 puede ser hidrófila por todo el grosor de la membrana porosa 14 y/o en la superficie.

65 La zona de reacción 16 puede presentar un único grado de hidrofiliación, como se representa en las figuras 2A,

3A y 4A. Esta configuración es particularmente adecuada para la detección de la presencia de anticuerpo específico en la muestra a analizar.

Según una variante, la zona de reacción 16 puede comprender varias zonas que presentan unos grados de hidrofiliación diferentes.

Como se representa en la figura 2B, 3B y 4B, la zona de reacción 16 puede comprender dos zonas hidrófilas 16-1, 16-2, con un grado de hidrofiliación más importante en el centro 16-1 de la zona de reacción que en la periferia 16-2. Estas zonas hidrófilas están preferentemente solo en la superficie de la membrana 14.

La zona de reacción 16 puede también comprender dos zonas hidrófilas con un grado de hidrofiliación diferente, una en la superficie, la otra en el grosor.

En el caso en el que una zona de reacción 16 comprende dos zonas hidrófilas, la zona de reacción 16 se ha vuelto hidrófila con dos detergentes diferentes sin modificación de las funciones químicas del sustrato poroso por un tratamiento químico o físico previo de la membrana porosa.

Ventajosamente, la configuración de la zona de reacción 16 con dos regiones que presentan una hidrofiliación diferente, en particular en la superficie, tal como se representa en las figuras 2B, 3B y 4B, permite responder a una preocupación particular de los profesionales de la transfusión, a saber distinguir la eventual coexistencia de dos poblaciones, siendo una positiva y la otra negativa, fenómeno denominado doble población. Esta configuración es particularmente adecuada para la detección y la identificación de antígenos particulares en la muestra a ensayar.

La zona de reacción hidrófila 16 de la membrana porosa 14 puede comprender agentes de captura. Los agentes de captura se absorben o se unen de manera covalente a la membrana 14.

Por agentes de captura, se entiende cualquier elemento químico o biológico fijado sobre la zona 16 capaz de retener el analito de interés contenido en la muestra a ensayar, solo o complejoado con un agente de revelación.

Cuando se busca identificar la presencia de anticuerpos particulares en la muestra a ensayar, estos agentes de captura comprenden unos antígenos de fenotipo eritrocitario particulares. Puede tratarse de antígenos purificados o no, de fragmentos o membranas de células que tienen los antígenos, unas células vacías o no que portan los antígenos, o también de proteínas recombinantes o de antígenos obtenidos por síntesis. Preferentemente, los agentes de capturas son hematíes vacíos de hemoglobina, portadores de los antígenos.

Cuando se busca identificar la presencia de antígenos particulares en la muestra a ensayar, los agentes de captura son anticuerpos.

Los agentes de captura, cuando están presentes en la zona de reacción 16, se pueden depositar al mismo tiempo que el detergente que sirve para hidrofilar la membrana 14 para delimitar la zona de reacción 16, o bien después de la hidrofiliación, independientemente del detergente.

Los agentes de captura se pueden depositar sobre la zona de reacción 16 en un tampón no desnaturalizante constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 4 y pH 10, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, aún más preferentemente entre pH 7 y pH 7,5. Los agentes de captura se pueden absorber o bien unir de manera covalente.

Los agentes de captura se pueden adicionar de adyuvantes destinados a mantener su estabilidad microbiológica tales como azida de sodio, antibióticos, y su estabilidad conformacional tales como azúcares (sacarosa, dextrosa, trehalosa), así como cualquier otro agente conocido por el experto en la técnica para realizar estas funciones.

Los agentes de captura pueden estar presentes en toda la zona 16 o en una parte solamente.

El detergente y/o los agentes de captura se presentan preferentemente en forma de soluciones que se pueden depositar con la ayuda de pipeteadores robotizados o manuales. Ventajosamente, estas soluciones también se pueden depositar fácilmente utilizando agujas que retienen por capilaridad el volumen deseado. Estas agujas pueden ser de cualquier material, pero más particularmente metálicas, y presentar o no un revestimiento hidrófobo. Sus extremos pueden ser planos o presentar una muesca de un volumen determinado.

El depósito de las soluciones de detergente y/o de agentes de captura debe ir seguido de un secado de la membrana, dependiendo la duración del secado de la temperatura aplicada: por lo menos 4 horas a temperatura ambiente, por lo menos una hora a 37°C.

El dispositivo según la invención puede comprender una membrana absorbente 18 debajo de la membrana

porosa 14. Esta membrana 18 permite absorber los líquidos depositados a nivel de las zonas de reacción 16, que no son retenidos por la membrana 14, en particular cuando la zona de reacción 16 es hidrófila por todo el grosor de la membrana 14.

5 La membrana 18 puede estar constituida por una materia que permite una absorción pasiva por capilaridad como papel absorbente, celulosa, etc., o de polímeros absorbentes. A título de ejemplo, se pueden citar los productos siguientes:

- * Millipore C048, C068, C083, C248
- 10 * Whatman CF3, CF4, CF10, Grado 470, CF5, CF6, CF7, Grado 900, Grado 300
- * Ahlstrom Grados 601, 642, 631, 238, 237, 222, 243, 320
- * Pall Grados 111, 113, 133, 165, 197, 8975, 8964, 8301, Accuwik® Ultra
- * Cleanis Gelmax paño superabsorbente
- * Algodón

15 La composición de la membrana absorbente 18 y sus dimensiones se debe seleccionar con el fin de poder absorber el conjunto de las soluciones utilizadas durante el ensayo (V_{total} en μl). Cada membrana está caracterizada por una capacidad de absorción (C en $\mu l/cm^2$), por lo tanto se selecciona la membrana y sus dimensiones (D en cm^2) para satisfacer la ecuación siguiente: $D > V_{total}/C$.

20 De manera alternativa, el líquido se puede absorber por un diferencial de presión entre la zona encima de la membrana y la zona debajo de ésta. Por ejemplo, utilizando un sistema de aspiración con vacío parcial.

La membrana 14 y eventualmente la membrana 18 están dispuestas en un soporte 12.

25 El soporte 12 del dispositivo 10 según la invención es preferentemente un soporte rígido. Puede tratarse por ejemplo de una carcasa.

30 De manera preferida, el soporte está constituido por un material rígido que no puede dejar escapar líquido. Puede tratarse en particular de materiales plásticos, tales como el polipropileno, el polietileno, el poliestireno, el acrilonitrilo butadieno estireno, polietilentereftalato, policarbonato, poliamida, cloruro de polivinilo, poli-metacrilato de metilo.

35 El soporte 12 comprende preferentemente por lo menos un orificio 20, estando cada orificio 20 a nivel de cada zona de reacción hidrófila 16 de la membrana porosa 14. Este orificio 20 corresponde a la zona de recogida de la muestra depositada sobre la zona de reacción hidrófila 16. La zona hidrófila 16 puede ser de tamaño idéntico al del fondo del orificio, más pequeño o más grande, con la condición de que dos zonas hidrófilas estén siempre separadas por una zona hidrófoba sobre la membrana 14.

40 Los orificios 20 pueden tener unos bordes transparentes que permiten, llegado el caso, visualizar las señales subyacentes.

La zona de recogida debe ser de una dimensión tal que pueda contener por lo menos el volumen máximo de muestra a ensayar depositado sobre la membrana de reacción 16.

45 La independencia de cada zona de reacción 16 se obtiene por la barrera que constituye la membrana hidrófoba entre las zonas de reacción. Esta independencia permite realizar varios diagnósticos diferentes en un mismo dispositivo que comprende una única membrana. Según una variante, esta independencia también se puede materializar eventualmente segmentando el soporte 12 en unidades físicamente independientes separadas por unos tabiques que contienen cada uno su propia membrana.

50 Por otro lado, es posible mejorar el contacto entre las membranas 14 y 18 realizando alrededor del orificio 20 un sobreespesor, y en el fondo del orificio una bóveda opuesta la abertura de dicho orificio 20.

55 El soporte 12 puede ser una carcasa que presenta varios orificios 20, de dimensiones compatibles con el estándar SBS/AISI en sus dimensiones exteriores.

60 El dispositivo 10 según la invención se puede utilizar en la determinación de la presencia o ausencia de un analito en un fluido biológico, en particular en la sangre o uno de sus constituyentes por capilaridad. Este analito puede ser un antígeno de fenotipo eritrocitario o un anticuerpo dirigido contra este antígeno.

El dispositivo 10 se puede utilizar, en particular, para:

- el fenotipaje de glóbulos rojos, es decir la determinación de los antígenos en su superficie.
- 65 - la prueba denominada de Simmonin que identifica la presencia de anticuerpos anti-A o anti-B,

- la búsqueda o la identificación de anticuerpos dirigidos contra unos antígenos celulares, en particular eritrocitarios, en el ámbito de la búsqueda de alo-anticuerpos, de auto-anticuerpos o también de aglutininas frías.

De manera específica, la invención tiene por lo tanto como objetivo la utilización de un dispositivo 10 para identificar y determinar unos grupos sanguíneos ABO, el fenotipaje Rhesus extendido, la búsqueda de aglutinina irregular, la búsqueda de auto-anticuerpos, la búsqueda de antiglobulina fría y/o la validación cruzada, a partir de una muestra de sangre o uno de sus componentes.

La utilización del dispositivo 10 según la invención necesita la utilización de un agente de revelación. Preferentemente, se trata de hematíes. Estos hematíes:

- son unos hematíes de fenotipo conocido, denominados hematíes de ensayos, para la utilización del dispositivo para la búsqueda de anticuerpos o la prueba de Simmonin,
- son los contenidos en la muestra a ensayar para la utilización del dispositivo para el fenotipaje.

En función del analito del que se busca detectar la presencia en la muestra a ensayar, se necesita hacer variar la naturaleza del agente de captura, la naturaleza del agente de revelación, el método de hidrofiliación (simple o múltiple, en grosor o en superficie) y el protocolo seguido.

En todos los casos, antes del depósito de la muestra a ensayar sobre la zona reactiva, es posible proceder a una hidratación de la zona de reacción 16 con la ayuda de una solución tampón. Este tampón puede estar constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y la osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede contener eventualmente detergentes a baja concentración (Tween 20 0,01 all 0,05% m/v), agentes de saturación (BSA) y/o agentes capaces de potenciar las reacciones antígeno-anticuerpo.

Asimismo, para poder leer los resultados, es necesario utilizar un tampón de aclarado. Este tampón de lavado está preferentemente constituido por PBS, TBS o solución salina de pH comprendido entre 2 y 10, preferentemente entre 5 y 9. La osmolaridad del tampón se debe controlar para evitar la hemólisis de los glóbulos rojos. El tampón se debe seleccionar para no separar los agentes de revelación o los analitos coloreados fijados directa o indirectamente a los agentes de captura. De manera sorprendente, para la utilización del dispositivo según la invención, es preferible utilizar unas soluciones de lavado ligeramente hiperosmóticas (es decir entre 300 mOsm y 800 mOsm) obtenidas mediante la presencia de agentes salinos como el NaCl o de osmolitos no iónicos como, por ejemplo, la glicina o la taurina. Este tampón se puede colorear con unos colores que contrasten con el color del agente de revelación. Por ejemplo, si los agentes de revelación son unos hematíes, la solución tampón de lavado se puede colorear en azul o verde. Es asimismo posible añadir una baja dosis de tensioactivo en la solución de lavado para eliminar el ruido de fondo. Estos tensioactivos son preferentemente unos tensioactivos no iónicos, en particular los ésteres de azúcar, en particular los ésteres de sorbitán polioxietilénicos (Tween).

Durante la utilización del dispositivo 10, los depósitos de líquidos se pueden llevar a cabo en particular con la ayuda de un sistema pipeteador o con la ayuda de un sistema de replicación por capilaridad.

Ventajosamente, el dispositivo según la invención no necesita ni centrifugación, ni agitación, ni puesta al vacío, ni dispositivo *ad hoc*. También se puede utilizar manualmente de manera totalmente autónoma, y automatizar fácilmente en robots. Las diferentes características de la membrana 14 permiten controlar la velocidad de paso y obtener unos tiempos de pasos suficientemente largos para permitir la reacción antígeno-anticuerpo, a pesar de los tamaños de porosidad de la membrana 14, que sin embargo son significativos.

Según una primera variante, la invención tiene como objetivo la utilización del dispositivo 10 para el fenotipaje de los glóbulos rojos.

El objetivo es buscar antígenos en la superficie de glóbulos rojos. En este caso, se utiliza como agente de captura un anticuerpo o una mezcla de anticuerpo, capaz de reconocer específicamente el antígeno en cuestión o una variante de un antígeno. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal purificado o semi-purificado, un sobrenadante de cultivo que contiene el anticuerpo monoclonal (véase la tabla 1) o un anticuerpo policlonal, un antisuero. Se pueden utilizar también aglutininas o lectinas.

De manera no exhaustiva, se pueden citar los anticuerpos monoclonales siguientes:

Tabla 1: lista no exhaustiva de los anticuerpos de captura que se pueden utilizar para el fenotipaje globular

Antígeno buscado	Elemento de captura	Ej. de clones de referencia	Elemento de revelación
A	Ac Anti-A	BIRMA-1,	Glóbulos rojos de la muestra
B	Ac Anti-B	LB-2 y/o ES-4	Glóbulos rojos de la muestra
AB	Ac Anti-AB	ES-4 y/o ES-15 y/o BH517	Glóbulos rojos de la muestra
D (RH1)	Ac Anti-D	RUM-1 y/o MS-201 y/o MAD-2 y/o TH-28 y/o MS-26	Glóbulos rojos de la muestra
C (RH2)	Ac Anti-C	MS-273 o MS-24	Glóbulos rojos de la muestra
c (RH4)	Ac Anti-c	MS-33	Glóbulos rojos de la muestra
E (RH3)	Ac Anti-E	MS-258, MS-80	Glóbulos rojos de la muestra
e (RH5)	Ac Anti-e	MS-16, MS-21, MS-63	Glóbulos rojos de la muestra
K	Ac Anti-K	MS-56	Glóbulos rojos de la muestra
Fya (FY1)	Ac Anti-Fya	P3TIM	Glóbulos rojos de la muestra
Fyb (FY2)	Ac Anti-Fyb		Glóbulos rojos de la muestra
Jka (JK1)	Ac Anti-Jka	MS-15	Glóbulos rojos de la muestra
Jkb (JK2)	Ac Anti-Jkb	MS-8	Glóbulos rojos de la muestra
S (MNS3)	Ac Anti-S	MS-94	Glóbulos rojos de la muestra
s (MNS4)	Ac Anti-s	P3BER L	Glóbulos rojos de la muestra
Lea (LE1)	Ac Anti-Lea	LM112/161	Glóbulos rojos de la muestra
Leb (LE2)	Ac Anti-Leb	LM129/181	Glóbulos rojos de la muestra
M (MNS1)	Ac Anti-M	M110/140	Glóbulos rojos de la muestra
N (MN52)	Ac Anti-N		Glóbulos rojos de la muestra
P1	Ac Anti-Pl	P3MON23	Glóbulos rojos de la muestra
Kpa (KEL3)	Ac Anti-Kpa		Glóbulos rojos de la muestra
Lua (LU1)	Ac Anti-Lua		Glóbulos rojos de la muestra
Lub (LU2)	Ac Anti-Lub		Glóbulos rojos de la muestra
k, cellano (KEL 2)	Ac Anti-k		Glóbulos rojos de la muestra
Kpb (KEL4)	Ac Anti-Kpb		Glóbulos rojos de la muestra
Cw	Ac Anti-Cw		Glóbulos rojos de la muestra

Según un modo de realización particular, la invención tiene como objetivo un procedimiento de fenotipaje de grupos sanguíneos eritrocitarios, a partir de una muestra de glóbulos rojos (glóbulos rojos puros o sangre total), que permite la detección simultánea de una población de fenotipo positivo y de una población de fenotipo negativo (doble población), que comprende las etapas siguientes:

- depositar una solución para hidratar la membrana porosa 14 en el centro de la zona de reacción de un dispositivo 10 según la invención, comprendiendo dicha zona de reacción 16 dos zonas hidrófilas 16-1, 16-2 con un grado de hidrofiliación más importante en el centro 16-1 de la zona de reacción que en la periferia 16-2, y que comprende en el centro agentes de captura que comprenden unos anticuerpos; la solución para la hidratación de la membrana es una solución conocida por ser propicia para las reacciones inmuno-hematológicas que contienen eventualmente aditivos, como por ejemplo un tampón constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede eventualmente contener detergentes a baja concentración (en particular Tween 20 del 0,01 al 0,05% m/v), agentes de saturación (por ejemplo BSA), y/o agentes capaces de potenciar las reacciones antígeno-anticuerpo. Este tampón puede eventualmente presentar una actividad proteásica, por ejemplo, obtenida por la adición de enzimas tales como la papaína o la bromelaína. Este tampón puede eventualmente contener agentes policatiónicos como el polibreno o la polilisina, que permite potenciar la reacción y mantener más tiempo los glóbulos en contacto con el elemento de captura;
- diluir los glóbulos rojos a fenotipar en una solución tampón, a saber una solución tampón conocida por ser propicia para las reacciones inmunohematológicas que contienen eventualmente aditivos como, por ejemplo, un tampón constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede contener eventualmente detergentes a baja concentración (en particular Tween 20 del 0,01 al 0,05% m/v), agentes de saturación (por ejemplo BSA) y/o agentes capaces de potenciar las reacciones antígeno-anticuerpo. Este tampón puede eventualmente presentar una actividad proteásica, por ejemplo obtenida por adición de enzimas tales como la papaína o la bromelaína. Este tampón puede contener eventualmente agentes policatiónicos como el polibreno o la polilisina, que permiten potenciar la reacción y mantener más tiempo los glóbulos en contacto con los elementos de captura;

- añadir esta solución que contiene los glóbulos rojos a fenotipar en el centro de la zona de reacción 16-1;
- incubar, preferentemente a una temperatura comprendida entre 15 y 40°C, en particular entre 18°C y 25°C, durante un tiempo de 60 segundos a 15 minutos, en particular durante 2 minutos a 10 minutos;
- depositar una solución de aclarado sobre la zona de reacción; siendo la solución de aclarado una solución conocida por no ser perjudicial para las reacciones antígenos-anticuerpos, manteniendo la integridad de los glóbulos rojos y capaz de deshacer las interacciones no específicas, como por ejemplo un tampón constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede contener eventualmente detergentes a baja concentración (en particular Tween 20 de 0,01 al 0,05% m/v), agentes de saturación (por ejemplo BSA) y/o agentes capaces de potenciar las reacciones antígenos-anticuerpos. En el caso de utilización previa de agente policatiónico, este tampón deberá ser fuertemente iónico, por ejemplo, deberá contener más de 100 mM de NaCl para poder deshacer las interacciones no específicas provocadas por este tipo de aditivo.

La muestra a depositar puede ser glóbulos rojos o sangre total. La muestra se puede diluir en un tampón constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede contener eventualmente detergentes a baja concentración (en particular Tween 20 de 0,01 a 0,05% m/v), agentes de saturación (por ejemplo BSA) y/o agentes capaces de potenciar las reacciones antígeno-anticuerpo. Este tampón puede eventualmente presentar una actividad proteásica por ejemplo obtenida mediante la adición de enzimas tales como la papaína o la bromelaína.

La hidrofiliación de las zonas de reacción 16 de la membrana 14 del dispositivo 10 utilizada para la realización de este procedimiento es preferentemente una hidrofiliación en superficie.

La hidrofiliación se puede realizar por ejemplo con la ayuda de una solución de Tween 20 en etanol de concentración comprendida entre el 0,1% m/v y el 1% m/v, preferentemente el 0,2% m/v y el 1% m/v de volumen comprendido entre 2 µl y 40 µl y preferentemente entre 5 µl y 20 µl en el centro del cual se crea una zona de hidrofiliación en el grosor realizada con la ayuda de una solución acuosa de Triton X100 de concentración comprendida entre el 0,1% m/v y el 2% m/v, preferentemente el 0,5% m/v y el 1% m/v de volumen comprendido entre 25 nl y 15 µl y preferentemente entre 100 nl y 10 µl.

Si los glóbulos rojos presentes en la muestra tienen el antígeno reconocido por el elemento de captura, los glóbulos rojos quedan inmovilizados en el centro de la zona de reacción 16 de la membrana 14 a pesar del aclarado y la zona de reacción central 16-1 permanece roja. Si los glóbulos rojos presentes en la muestra no tienen el antígeno reconocido por el elemento de captura, los glóbulos rojos se eliminan mediante el aclarado: la zona central 16-1 permanece blanca y se forma un anillo rojo en la zona periférica 16-2. Si la muestra contiene dos poblaciones diferentes, se observa al mismo tiempo un centro rojo 22-1 y un anillo periférico rojo 22-2.

La lectura de los resultados puede ser visual o automática.

Según otro modo de realización particular, la invención tiene como objetivo un procedimiento de fenotipaje de grupos sanguíneos eritrocitarios, a partir de una muestra de glóbulos rojos (glóbulos rojos puros o sangre total), que no permite la detección de dobles poblaciones, que comprende las etapas siguientes:

- * depositar una solución para hidratar la membrana porosa 14 en el centro de la zona de reacción de un dispositivo 10 según la invención, comprendiendo dicha zona de reacción 16 una sola zona hidrófila y comprendiendo agentes de captura que comprenden anticuerpos; la solución para la hidratación de la membrana es una solución conocida por ser propicia para las reacciones inmuno-hematológicas que contienen eventualmente aditivos, como por ejemplo un tampón constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede eventualmente contener detergentes a baja concentración (en particular Tween 20 del 0,01 al 0,05% m/v), agentes de saturación (por ejemplo BSA) y/o agentes capaces de potenciar las reacciones antígeno-anticuerpo. Este tampón puede eventualmente presentar una actividad proteásica, por ejemplo obtenida mediante la adición de enzimas tales como la papaína o la bromelaína. Este tampón puede eventualmente contener agentes policatiónicos como el polibreno o la polilisina, que permiten potenciar la reacción y mantener más tiempo los glóbulos rojos en contacto con los elementos de captura;
- * eventualmente diluir los glóbulos rojos a fenotipar en una solución tampón, a saber una solución tampón conocida por ser propicia a las reacciones inmuno-hematológicas que contiene eventualmente unos

aditivos, como por ejemplo un tampón constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede eventualmente contener detergentes a baja concentración (en particular Tween 20 del 0,01 al 0,05% m/v), agentes de saturación (por ejemplo BSA) y/o agentes capaces de potenciar las reacciones antígeno-anticuerpo. Este tampón puede eventualmente presentar una actividad proteásica por ejemplo obtenida mediante la adición de enzimas tales como la papaína o la bromelaina. Este tampón puede eventualmente contener agentes policatiónicos como el polibreno o la polilisina, que permite potenciar la reacción y mantener más tiempo los glóbulos en contacto con el elemento de captura;

- * añadir esta solución que contiene los glóbulos rojos a fenotipar en el centro de la zona de reacción,
- * incubar, preferentemente a una temperatura comprendida entre 15 y 40°C en particular entre 18°C y 25°C, durante un tiempo de 2 segundos a 15 minutos y en particular durante 1 minuto a 10 minutos;
- * depositar una solución de aclarado sobre la zona de reacción, siendo la solución de aclarado conocida por no ser perjudicial para las reacciones antígenos-anticuerpos, manteniendo la integridad de los glóbulos rojos y capaz de deshacer las interacciones no específicas, como por ejemplo un tampón constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, preferentemente entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede eventualmente contener detergentes a baja concentración (en particular Tween 20 del 0,01 al 0,05% m/v), agentes de saturación (por ejemplo BSA) y/o agentes capaces de potenciar las reacciones antígeno-anticuerpo. En el caso de utilización previa de agente policatiónico, este tampón deberá ser fuertemente iónico, por ejemplo, deberá contener más de 100 mM de NaCl para poder deshacer las interacciones no específicas provocadas por este tipo de aditivo.

La hidrofiliación de las zonas de reacción 16 de la membrana 14 del dispositivo 10 utilizado para la realización de este procedimiento puede ser una hidrofiliación en el grosor. Es necesario que el dispositivo 10 comprenda también un sistema de absorción subyacente a la membrana 14, por ejemplo una membrana absorbente 18.

La hidrofiliación se puede realizar con la ayuda de una solución acuosa de Triton X100 de concentración comprendida entre el 0,1% m/v y el 2% m/v, preferentemente el 0,5% m/v y el 1% w/v de volumen comprendido entre 25 nl y 15 µl y preferentemente entre 100 nl y 10 µl.

Si los glóbulos rojos presentes en la muestra tienen el antígeno reconocido por el elemento de captura, los glóbulos rojos permanecen inmovilizados en el centro 22 de la zona de reacción 16 de la membrana 14 a pesar del aclarado y la zona de reacción 16 permanece roja. Si los glóbulos rojos presentes en la muestra no tienen el antígeno reconocido por el elemento de captura, los glóbulos rojos se eliminan mediante el aclarado y la zona de reacción 16 permanece blanca. La membrana absorbente 18 absorbe (zona 24) todo lo que no está fijado sobre la membrana 14.

La lectura de los resultados puede ser visual o automática.

Según una segunda variante, la invención tiene como objetivo la utilización del dispositivo 10 para la detección de anticuerpos multivalentes en la sangre o prueba de Simonin.

El objetivo es buscar unos anticuerpos específicos. El elemento de captura comprende por lo tanto el antígeno contra el cual se dirige el anticuerpo buscado.

Los antígenos inmovilizados pueden ser unos antígenos sintéticos acoplados o no a un polímero o a una estructura proteica. Puede tratarse también de proteínas recombinantes que contienen una o varias secuencias del antígeno o de una mezcla de antígeno de variantes deseadas. Los antígenos inmovilizados pueden también estar sobre unas células o fragmentos de células. En particular unos fragmentos membranaarios o unas células vaciadas de su contenido citoplásmico. Estas células pueden ser, en particular, unos glóbulos rojos vaciados de su citoplasma que se denominan también "ghosts".

Si la muestra posee unos anticuerpos dirigidos contra el antígeno en cuestión, estos permanecerán capturados en la superficie de la membrana 14 a nivel de la zona de reacción 16.

Es necesario utilizar un elemento de revelación para revelar la presencia de estos anticuerpos, o bien reconociendo su naturaleza de anticuerpo (anti-IgG, anti-IgM), o bien si el anticuerpo utilizado es multivalente (capaz de detectar varios antígenos simultáneamente), se puede utilizar un elemento de revelación que tiene también el antígeno en cuestión.

Tabla 2: Ejemplos que se refieren a la búsqueda de anticuerpos en el campo de la inmunohematología

Antígeno buscado	Elemento de captura	Elemento de revelación
IgM Anti-A	Ghosts A	Hematíes de ensayo A1
IgM Anti-B	Ghosts B	Hematíes de ensayo B

La invención tiene por lo tanto también como objetivo un procedimiento de detección de los anticuerpos multivalentes presentes en la sangre, a partir de una muestra de plasma, suero o sangre total, que comprende las etapas siguientes:

- depositar la muestra a ensayar sobre la zona de reacción 16 de un dispositivo 10, comprendiendo dicha zona de reacción 16 agentes de capturas que comprenden unos antígenos,
- añadir unos hematíes de ensayo de fenotipo conocido, que comprenden los mismos antígenos que los agentes de captura,
- dejar la mezcla pasar a través de la zona hidrófila, presentando dicha zona hidrófila unas características que permiten un tiempo de paso comprendido entre 1 y 45 minutos, preferentemente entre 3 y 15 minutos,
- depositar una solución de aclarado sobre la zona de reacción, como por ejemplo un tampón constituido por una solución de pH estabilizada entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede eventualmente contener detergentes a baja concentración (en particular Tween 20 del 0,01 al 0,05% m/v), agentes de saturación (por ejemplo BSA).

La muestra a depositar puede ser plasma, suero o sangre total diluida o no en un tampón constituido por una solución de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede eventualmente contener detergentes a baja concentración (por ejemplo Tween 20 del 0,01 al 0,05% m/v), agentes de saturación (en particular BSA) y/o agentes capaces de potenciar las reacciones antígeno-anticuerpo. Este tampón es preferentemente de salinidad inferior a 100 mM en NaCl.

La hidrofiliación de las zonas de reacción 16 de la membrana 14 del dispositivo 10 utilizado para la realización de este procedimiento se realiza preferentemente en espesor. Por lo tanto, es necesario que el dispositivo 10 comprenda también un sistema de absorción subyacente a la membrana 14, por ejemplo una membrana absorbente 18.

La hidrofiliación se puede realizar con la ayuda de una solución acuosa de Triton X100 de concentración comprendida entre el 0,3% m/v y el 2% m/v, preferentemente el 0,5% m/v y el 1% w/v de volumen comprendido entre 25 nl y 15 µl y preferentemente entre 100 nl y 10 µl. Los agentes de captura se pueden depositar sobre la membrana, mezclados con detergente, o después de la hidrofiliación de las zonas de reacción 16.

Si el plasma ensayado contiene unos anticuerpos dirigidos contra el antígeno presente en el agente de captura y en el agente de revelación (hematíes de ensayo), un centro rojo 22 aparece en la zona de reacción 16. Un centro blanco señala la ausencia en el plasma ensayado de los anticuerpos dirigidos contra el antígeno presente al mismo tiempo en el agente de captura y en el agente de revelación (hematíes de ensayo). La membrana absorbente 18 absorbe (zona 24) todo lo que no está fijado sobre la membrana 14.

La lectura de los resultados puede ser visual o automática.

Según una tercera variante, la invención tiene como objetivo la utilización del dispositivo 10 para la búsqueda de aglutinina irregular en la sangre.

El objetivo es identificar la presencia de hematíes sensibilizados por unos anticuerpos plasmáticos de la muestra o por una activación del complemento subsiguiente.

En este formato, o bien no hay agente de captura, o bien este es un agente de agregación como un polímero policatiónico.

Después de haber incubado los hematíes de ensayo del panel con el plasma, se añade a la mezcla un agente capaz de agregar de manera reversible los glóbulos rojos. Este agente de agregación reversible se puede seleccionar entre los polímeros policatiónicos como, por ejemplo, el polibreno, la polilisina o la polietilenimina. Los hematíes permanecen entonces retenidos y forman un botón de glóbulos ya que el tamaño de los agregados formados es demasiado grande para permitirles atravesar la membrana. Se aclaran los glóbulos del exceso de

globulinas no específicas con la ayuda de una solución que contiene también un agente de agregación con el fin de evitar la desestabilización del botón. Después de aclarar estos glóbulos retenidos, se añade un reactivo de Coombs multivalente que permite realizar una reticulación de las células del botón si éstas están sensibilizadas. La adición de un tampón salino y que contiene una baja dosis de tensioactivo permite romper los agregados de células no sensibilizadas y guardar los agregados de células sensibilizadas reticuladas.

Tabla 3: lista no exhaustiva de los anticuerpos utilizables en la búsqueda de aglutininas irregulares

Analito buscado	Agente de reticulación	Referencia clon	
IgG humana sobre hematíe de ensayo	Anti-IgG, proteína A, proteína G..	MS-278, proteína A, G, A/G	hematíe de ensayo
IgM humana sobre hematíe de ensayo	Anti-IgM		hematíe de ensayo
C3d humana sobre hematíe de ensayo	Anti-C3d	BRIC-8	hematíe de ensayo

Para la realización de estos procedimientos, la hidrofiliación de las zonas de reacción 16 de la membrana 14 del dispositivo 10 utilizado para la realización de este procedimiento se realiza preferentemente en espesor. Por lo tanto es necesario que el dispositivo 10 comprenda también un sistema de absorción subyacente a la membrana 14, por ejemplo una membrana absorbente 18.

La hidrofiliación se puede realizar con la ayuda de una solución acuosa de Triton X100 de concentración comprendida entre el 0,3% m/v y el 2% m/v, preferentemente el 0,5% m/v y el 1% w/v de volumen comprendido entre 25 nl y 15 µl y preferentemente entre 100 nl y 10 µl. Se puede añadir ventajosamente un agente de agregación reversible, preferentemente seleccionado entre los polímeros policationicos como, por ejemplo, el polibreno, la polilisina o la polietilenimina.

Según esta tercera variante, la invención tiene por lo tanto también como objetivo un procedimiento de detección de los anticuerpos anti-eritrocitarios presentes en la sangre, de validación cruzada o de búsqueda de auto-anticuerpos o de aglutinina fría, a partir de una muestra de plasma, suero o sangre total, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- para la búsqueda de aloanticuerpos, incubar previamente la muestra a ensayar con un tampón, unos hematíes de ensayo fenotipo conocido y un agente capaz de agregar los glóbulos rojos a una temperatura comprendida entre 15 y 40°C, preferentemente a 37°C aproximadamente, durante un tiempo comprendido entre 3 y 60 minutos, preferentemente entre 5 y 30 minutos; el tampón es un tampón de baja fuerza iónica, tal como un tampón LISS (por ejemplo que contiene menos de 50 mM de NaCl); para la búsqueda de autoanticuerpos, utilizar simplemente la muestra que contiene los hematíes de la muestra sin incubación previa;
- añadir a esta mezcla un agente capaz de agregar los glóbulos, por ejemplo una solución de bromuro de hexadimetrina;
- después de un periodo preferentemente comprendido entre 15 segundos y 5 minutos, depositar la mezcla sobre la zona de reacción 16 de un dispositivo 10 según la invención y dejar fluir; se forma un botón de células por encima del punto,
- depositar una solución que contiene el agente capaz de agregar los glóbulos rojos sobre la zona de reacción, el agente capaz de agregar los glóbulos rojos puede ser, por ejemplo, una solución de bromuro de hexadimetrina, preferentemente con una concentración en bromuro de hexadimetrina en la solución comprendida entre el 0,01 y el 2% (m/v), aún más preferentemente entre el 0,05 y el 0,5%; este agente permite realizar un aclarado de las proteínas no específicas manteniendo al mismo tiempo la integridad del botón de células;
- depositar un reactivo de Coombs, de antiglobulina humana o de anticomplemento sobre la zona de reacción, y
- depositar una solución de aclarado sobre la zona de reacción como, por ejemplo, una solución salina hipertónica de pH estabilizado entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, preferentemente entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 300 mOsm y 800 mOsm. Esta solución puede eventualmente contener detergentes a baja concentración (por ejemplo Tween 20 del 0,01 al 0,05% m/v) y un colorante de un color contrastante con el rojo (azul o verde).

La muestra a depositar puede ser plasma, suero o sangre total diluida o no en un tampón constituido por una solución de pH estabilizada entre pH 6 y pH 8,5, preferentemente entre pH 6,5 y pH 7,8, en particular entre pH 7 y pH 7,5 y de osmolaridad comprendida entre 250 mOsm y 800 mOsm, preferentemente entre 300 mOsm y 600 mOsm. Esta solución puede eventualmente contener detergentes a baja concentración (por ejemplo Tween 20 del 0,01 al 0,05% m/v), agentes de saturación (en particular BSA) y/o agentes capaces de potenciar las

reacciones antígeno-anticuerpo. Este tampón es preferentemente de salinidad inferior a 50 mM en NaCl.

5 Si el plasma ensayado contiene unos anticuerpos dirigidos contra el antígeno presente en el agente de revelación (hematíes de ensayo) o si los hematíes de la muestra están ya sensibilizados *in vivo*, aparece un centro rojo 22 en la zona de reacción 16. Un centro blanco señala la ausencia o una dosis no detectable de anticuerpos dirigidos contra el antígeno presente en el agente de revelación (hematíes de ensayo). La membrana absorbente 18 absorbe (zona 24) todo lo que no está fijado sobre la membrana 14.

10 La lectura de los resultados puede ser visual o automática.

10 El dispositivo 10 según la invención se puede dividir según una gama que agrupa sobre un mismo mapa los ensayos complementarios pertinentes efectuados lo más frecuentemente simultáneamente por los profesionales, efectuándose e interpretándose el conjunto de los ensayos de manera similar.

15 En cada uno de los mapas, se podrán detectar varios analitos dispuestos en columna para varias muestras (donantes o pacientes) dispuestos en línea. Puede tratarse por ejemplo de un mapa:

- de agrupamiento sanguíneo ABO-D,
- de agrupamiento Rhesus-Kell,
- 20 - de búsqueda de aglutinina irregular (3 fenotipos eritrocitarios).
- de identificación de las aglutininas irregulares (10 fenotipos eritrocitarios),
- de fenotipaje extendido,
- de control directo de la antiglobulina,
- 25 - de prueba de compatibilidad directa.

25 El dispositivo 10 según la invención puede presentarse en un kit que comprende también los reactivos necesarios para la realización de por lo menos uno de los procedimientos de utilización de dicho dispositivo.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (10) de diagnóstico *in vitro*, para la detección de por lo menos una reacción entre un antígeno de fenotipo eritrocitario y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno, a partir de una muestra de sangre o de uno de sus componentes, caracterizado por que comprende:
 - un soporte (12), y
 - una membrana porosa hidrófoba (14) de grosor comprendido entre 0,05 mm y 1,5 mm y cuyo diámetro de poros está comprendido entre 2 y 30 μm , comprendiendo dicha membrana por lo menos una zona de reacción hidrófila (16) destinada a recibir dicha muestra, siendo la superficie de la zona de reacción hidrófila (16) inferior a la superficie de la membrana porosa hidrófoba (14).
2. Dispositivo (10) de diagnóstico según la reivindicación 1, caracterizado por que la zona de reacción hidrófila (16) de la membrana porosa (14) se ha vuelto hidrófila con un detergente sin modificación de las funciones químicas del sustrato poroso por un tratamiento químico o físico previo de la membrana porosa.
3. Dispositivo (10) de diagnóstico según la reivindicación 2, caracterizado por que el detergente es un tensioactivo no iónico.
4. Dispositivo (10) de diagnóstico según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la membrana porosa (14) está dispuesta en el soporte (12), y por que el soporte (12) comprende por lo menos un orificio (20), estando cada orificio (20) a nivel de cada zona de reacción hidrófila (16) de la membrana porosa.
5. Dispositivo (10) de diagnóstico según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende también una membrana absorbente (18) dispuesta bajo la membrana porosa (14).
6. Dispositivo (10) de diagnóstico según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la zona de reacción hidrófila (16) de la membrana porosa (14) comprende también unos agentes de captura.
7. Dispositivo (10) de diagnóstico según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los agentes de captura comprenden unos antígenos de grupo/fenotipo eritrocitario.
8. Dispositivo (10) de diagnóstico según la reivindicación 7, caracterizado por que los agentes de captura son unos hematíes vaciados de hemoglobina.
9. Dispositivo (10) de diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que los agentes de captura son unos anticuerpos.
10. Dispositivo (10) de diagnóstico según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la zona de reacción (16) es hidrófila en todo el grosor de la membrana porosa.
11. Dispositivo (10) de diagnóstico según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la zona de reacción (16) comprende dos zonas hidrófilas (16-1, 16-2) con un grado de hidrofiliación más importante en el centro (16-1) de la zona de reacción que en la periferia (16-2).
12. Dispositivo (10) de diagnóstico según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que la zona de reacción (16) comprende dos zonas hidrófilas con un grado de hidrofiliación diferente, uno en superficie, el otro en el espesor.
13. Procedimiento de fabricación de un dispositivo (10) según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
 - hidrofilar una membrana porosa hidrófoba (14) de espesor comprendido entre 0,05 mm y 1,5 mm y cuyo diámetro de los poros está comprendido entre 2 y 30 μm , en por lo menos una zona (16) de dicha membrana, con la ayuda de por lo menos un detergente,
 - depositar eventualmente una solución de agente de captura,
 - secar,
 - ensamblar la membrana porosa (14) y eventualmente una membrana absorbente (18) dispuesta bajo la membrana porosa (14) con un soporte (12).
14. Utilización del dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 12, para identificar y determinar unos grupos sanguíneos ABO, el fenotipaje extendido, la búsqueda de aglutinina irregular, la búsqueda de auto-anticuerpos,

la búsqueda de antiglobulina fría y/o la validación cruzada, a partir de una muestra de sangre o de uno de sus componentes.

5 15. Procedimiento de fenotipaje de grupos sanguíneos eritrocitarios, a partir de una muestra de glóbulos rojos, que permite la detección de la presencia de dos poblaciones diferentes de antígenos, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- 10 - depositar una solución para hidratar la membrana porosa (14) en el centro de la zona de reacción de un dispositivo (10) según una de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicha zona de reacción (16) dos zonas hidrófilas (16-1, 16-2) con un grado de hidrofiliación más importante en el centro (16-1) de la zona de reacción que en la periferia (16-2), y que comprende en el centro unos agentes de captura que comprenden unos anticuerpos,
- 15 - diluir los glóbulos rojos a fenotipar en una solución tampón,
- añadir esta solución que contiene los glóbulos rojos a fenotipar en el centro de la zona de reacción,
- incubar,
- 20 - depositar una solución de aclarado sobre la zona de reacción.

16. Procedimiento de fenotipaje de grupos sanguíneos eritrocitarios, a partir de una muestra de glóbulos rojos, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- 25 - depositar una solución para hidratar la membrana porosa (14) a nivel de la zona de reacción (16) de un dispositivo (10) según una de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicha zona de reacción (16) una sola zona hidrófila y comprendiendo unos agentes de captura que comprenden unos anticuerpos,
- 30 - diluir eventualmente los glóbulos rojos a fenotipar en una solución tampón,
- añadir esta solución que contiene los glóbulos rojos a fenotipar en el centro de la zona de reacción,
- incubar,
- 35 - depositar una solución de aclarado sobre la zona de reacción.

17. Procedimiento de detección de los anticuerpos multivalentes presentes en la sangre, a partir de una muestra de plasma, de suero o de sangre total, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- 40 - depositar la muestra a ensayar sobre la zona de reacción (16) de un dispositivo (10) según una de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicha zona de reacción (16) unos agentes de captura que comprenden unos antígenos,
- 45 - añadir unos hematíes de ensayo de fenotipo conocido, que comprenden los mismos antígenos que los agentes de captura,
- dejar que la mezcla pase a través de la zona hidrófila,
- 50 - depositar una solución de aclarado sobre la zona de reacción.

18. Procedimiento de detección de los anticuerpos anti-eritrocitarios presentes en la sangre, de validación cruzada o de búsqueda de auto-anticuerpos o de aglutinina fría, a partir de una muestra de plasma, de suero o de sangre total, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- 55 - incubar la muestra a ensayar con un tampón y unos hematíes de ensayo de fenotipo conocido,
- añadir a esta mezcla un agente capaz de agregar los glóbulos rojos,
- 60 - depositar la mezcla sobre la zona de reacción (16) de un dispositivo (10) según una de las reivindicaciones 1 a 5,
- depositar una solución que contiene un agente capaz de agregar los glóbulos rojos sobre la zona de reacción,
- 65 - depositar un reactivo de Coombs, de antiglobulina humana o de anti-complemento sobre la zona de reacción, y

- depositar una solución de aclarado sobre la zona de reacción.

