

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 865**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/80** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2016 PCT/IB2016/050157**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16113691**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2016 E 16701207 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3245516**

54 Título: **Sistemas y procedimientos de análisis de sangre**

30 Prioridad:

**14.01.2015 EP 15151176**

**23.01.2015 US 201562107114 P**

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

**11.06.2020**

73 Titular/es:

**BIO-RAD LABORATORIES, INC. (50.0%)**

**1000 Alfred Nobel Drive**

**Hercules, CA 94547, US y**

**BIO-RAD EUROPE GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BUFFIÈRE, FRÉDÉRIC;**

**VILLARD-SAUSSINE, SYLVIE;**

**RIVALIN, ELIANE;**

**GUILLON, LAURENT y**

**GUEGAN, JOHANN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 765 865 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

Sistemas y procedimientos de análisis de sangre

La presente invención se refiere en general a un sistema y procedimiento para el análisis de muestras de un paciente tal como muestras de sangre.

5 **Antecedentes**

Millones de personas donan su sangre cada año. Antes de que la sangre de un donante se pueda transfundir en un receptor, la sangre se tiene que tipar. Normalmente, la sangre se ensaya en cuanto a los grupos sanguíneos ABO y RH1 (antígeno D de Rhesus) y se exploran en cuanto a anticuerpos aloinmunitarios de significación clínica. Para determinar el grupo sanguíneo, se hacen reaccionar los glóbulos rojos sanguíneos (RBC o eritrocitos) por separado con anticuerpos anti-A, anti-B, anti-AB y anti-D. Este tipo de ensayo se conoce como tipado antigénico (por ejemplo, agrupamiento y fenotipado). El suero/plasma de la misma muestra de sangre también se ensaya individualmente con reactivos de RBC de Tipo A y Tipo B y al menos dos reactivos de células de Tipo O que representan la mayoría de los antígenos de significación clínica. El tipo de ensayo con los reactivos de las RBC de Tipo A y Tipo B se conoce como tipado inverso y el tipo de ensayo con los reactivos de células de Tipo O se conoce como exploración con anticuerpos.

15 Más de 150 millones de ensayos se llevan a cabo anualmente en los centros de donación de sangre para determinar los grupos sanguíneos, así como los anticuerpos de significación clínica en el suero/plasma.

La Patente de EE. UU. 8.546.084 desvela procedimientos y dispositivos para la identificación y determinación de los antígenos de grupos sanguíneos que implican la aplicación de una muestra de células sanguíneas en una superficie que tiene reactivos de unión inmovilizados en ella, retirando los antígenos sanguíneos no unidos mediante "lavado" y la detección de los antígenos sanguíneos unidos.

20 En general, se necesita la transfusión de sangre en situaciones de urgencia para las que es deseable determinar la compatibilidad entre el donante y el receptor en un tiempo tan corto como sea posible. Se desea, por lo tanto, un sistema y un procedimiento automáticos de alto rendimiento de tipado sanguíneo que pueda ensayar múltiples muestras a la vez y que pueda proporcionar resultados rápidos del ensayo. Adicionalmente, también es deseable que se necesite menos muestra de sangre del paciente. Se conoce un distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico y su uso para la retirada de agentes bioquímicos de las superficies gracias a J. Autebert y col., Langmuir (ACS) 30(12):3640-45 (2014).

**Sumario**

30 En un primer aspecto de la invención que se proporciona es un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de una sustancia en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

(i) la aplicación de la muestra en una superficie de un sustrato que tienen un agente de unión inmovilizado en este, en el que el agente de unión es capaz de unirse a una sustancia en la muestra; la retirada del material de al menos una parte del sustrato que tiene un agente de unión inmovilizado; y la respuesta al detectar la sustancia unida al agente inmovilizado en el sustrato, identificando la sustancia presente en la muestra; y la respuesta a no detectar la sustancia unida al agente de unión inmovilizado en el sustrato, determinando que la sustancia está ausente en la muestra; caracterizado por que la etapa de aplicación de la muestra en la superficie de sustrato es concurrente con la etapa de retirada del material no unido en al menos una parte de sustrato, y las etapas de aplicación de una muestra en la superficie del sustrato y retirada del material no unido de al menos una parte de sustrato se llevan a cabo con un distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico en el que el distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico es una sonda de microfluídica que tiene múltiples microcanales. En una realización, el distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico es una matriz de sondas de microfluídica.

45 En un segundo aspecto de la invención se proporciona un sistema para llevar a cabo el procedimiento anterior del primer aspecto de determinación de la presencia o ausencia de una sustancia en una muestra, y un sistema que comprende: un sustrato que tiene un agente de unión inmovilizado en una localización diferente, en el que los agentes de unión son capaces de unirse a una sustancia den una muestra, un distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico configurado para distribuir de manera concurrente una muestra en el sustrato y para retirar el material no unido del sustrato, siendo dicho distribuidor de confinamiento de flujo una sonda de microfluídica que tiene una pluralidad de microcanales; y un detector configurado para detectar la presencia o ausencia de la sustancia unida al agente de unión.

50 Las realizaciones preferidas del sistema y procedimiento anteriores son sistemas de análisis de sangre y procedimientos de uso de estos sistemas para analizar muestras de sangre. Más particularmente, la divulgación se refiere a sistemas y procedimientos para la detección del grupo y fenotipo de eritrocitos (tipado de antígenos), para la exploración e identificación del tipado inverso típico de anticuerpos anti-eritrocíticos (exploración con anticuerpos), para la determinación de la compatibilidad entre un donante y un receptor (coincidencia cruzada) y para la demostración de eritrocitos revestidos con anticuerpos y/o con fracciones de complemento del suero activado (por ejemplo, un ensayo de antiglobulina directo).

En algunas realizaciones, el distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico incluye estructuras para la separación

de plasma de los glóbulos rojos sanguíneos en una muestra de sangre completa. En una realización para la separación de los glóbulos rojos sanguíneos del plasma, el microcanal tiene un diámetro de menos de 6  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el diámetro es menor de 4  $\mu\text{m}$  o menos de 2  $\mu\text{m}$  o 1 o 2  $\mu\text{m}$ . La sección transversal del microcanal puede ser de cualquier forma apropiada incluyendo, rectangular, cuadrada, circular, oval o elíptica o una combinación de estas.

En algunas realizaciones, la superficie del sustrato está húmeda. En algunas realizaciones, la etapa de aplicación de una muestra en la superficie de sustrato comprende la distribución de una o más muestras cada una en al menos una vía diferente. En ciertas realizaciones, la vía es una línea recta. En algunas realizaciones la vía tiene una anchura desde 25 nm a 500  $\mu\text{m}$ . En una realización, la etapa de aplicación de una muestra en la superficie de sustrato comprende la distribución de una o más muestras cada una en al menos un punto diferente. En algunas realizaciones, el al menos un punto diferente tiene desde 25 nm a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunas realizaciones, la muestra se selecciona de entre un grupo que consiste en sangre completa, glóbulos rojos sanguíneos, plasma, suero y saliva.

En una realización, el uno o más agentes de unión comprenden uno o más anticuerpos, o fragmentos de los mismos, o algunas lectinas específicas, contra los antígenos de los glóbulos rojos sanguíneos y la sustancia que se detecta en la muestra son los antígenos de glóbulos rojos sanguíneos.

En otra realización, el uno o más agentes de unión comprenden uno o más glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados, antígenos de grupos sanguíneos polisacarídicos y polipeptídicos sintetizados químicamente, antígenos recombinantes de glóbulos rojos sanguíneos o extractos de membrana de glóbulos rojos sanguíneos y la sustancia es uno o más anticuerpos, o fragmentos de los mismos, contra los antígenos de los glóbulos rojos sanguíneos, los antígenos recombinantes de los glóbulos rojos sanguíneos o los extractos de membrana de glóbulos rojos sanguíneos.

En otra realización más, el agente de unión es un agente de unión multi-parte. La primera parte depositada sobre el sustrato comprende lectinas o uno o más anticuerpos, o fragmentos de los mismos, contra los antígenos de glóbulos rojos sanguíneos. Los anticuerpos son anticuerpos universales contra los glóbulos rojos sanguíneos. La segunda parte del agente de unión depositado sobre el sustrato son glóbulos rojos sanguíneos fenotipados o no fenotipados de un donante potencial de sangre y se unen al agente de unión. La sustancia es plasma de un paciente que necesita una transfusión de sangre y los anticuerpos, o fragmentos de los mismos del plasma del paciente se unen a los glóbulos rojos sanguíneos del donante.

En otra realización más, el uno o más agentes de unión comprenden uno o más anticuerpos, o fragmentos de los mismos, contra inmunoglobulinas humanas y/o fracciones de complemento sérico activado y la sustancia son los glóbulos rojos sanguíneos revestidos de anticuerpos y/o con fracciones de complemento sérico activado.

En algunas realizaciones, el uno o más agentes de unión están inmovilizados en líneas separadas. En algunas realizaciones, el uno o más agentes de unión están inmovilizados en puntos separados. En algunas realizaciones, se unen de 1 a 100 agentes de unión a la superficie del sustrato.

### **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 muestra una vista esquemática de un sistema de análisis de sangre de acuerdo con una realización de la invención.

La FIG. 2 muestra una vista superior de un sustrato que tienen una matriz de agentes de unión aplicada en este en el que una muestra (por ejemplo, RBC) se aplica con una sonda de microfluídica de acuerdo con una realización de la invención. La realización se puede utilizar para el tipado de antígenos y los agentes de unión son anticuerpos contra los RBC.

La FIG. 3 muestra una vista superior de un sustrato que tienen una matriz de agentes de unión aplicada en este en el que una muestra (por ejemplo, un plasma que tiene anticuerpos) se aplica con una sonda de microfluídica de acuerdo con otra realización de la invención. La realización se puede utilizar para la exploración de anticuerpos y/o la identificación y los agentes de unión son RBC fenotipados hemolizados o antígenos recombinantes de grupos sanguíneos.

La FIG. 4 muestra una vista superior de un sustrato que tienen una matriz de agentes de unión aplicada en este en el que una muestra (por ejemplo, RBC y/o un plasma que tiene anticuerpos) se aplica con una sonda de microfluídica de acuerdo con otra realización de la invención. La realización se puede utilizar tanto para el tipado de antígenos como para exploración y/o identificación de anticuerpos.

Las FIG. 5A y 5B muestran una sonda de microfluídica de la técnica anterior.

La FIG. 6 muestra una vista superior de una sonda de microfluídica de acuerdo con una realización de la invención.

La FIG. 7 muestra una vista superior de una sonda de microfluídica de acuerdo con otra realización de la invención.

La FIG. 8 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento de aplicación de una muestra en una superficie

de un sustrato en el que se ha inmovilizado previamente RBC fenotipados nativos o hemolizados y/o anticuerpos contra los RBC utilizando el sistema de la Figura 1 de acuerdo con una realización de la invención.

Las FIG. 9 y 10 muestran múltiples sondas de microfluídica en paralelo conectadas a una única muestra o muestras diferentes de acuerdo con una realización de la invención.

5 La FIG. 11 muestra una sonda de microfluídica que tiene una pluralidad de microcanales procesadores de líquido, que se pueden conectar a una única muestra o múltiples muestras, de acuerdo con una realización de la invención.

La FIG. 12 es un diagrama de flujo que presenta un procedimiento para hacer coincidir de manera cruzada el plasma del paciente con glóbulos rojos sanguíneos de un donante potencial de acuerdo con una realización de la invención.

10 Las FIG. 13A y 13B muestra los resultados del tipado de antígeno singleplex utilizando una sonda de microfluídica como se describe en el Ejemplo 5A. La FIG. 13B es una vista ampliada de uno de los puntos que se muestran en la FIG. 13A.

Las FIG. 14A y 14D muestra los resultados del tipado de antígeno multiplex utilizando una sonda de microfluídica como se describe en el Ejemplo 5B.

15 La FIG. 15 muestra los resultados del ensayo directo de antiglobulina utilizando una sonda de microfluídica como se describe en el Ejemplo 6.

La FIG. 16 muestra los resultados de la exploración con anticuerpos utilizando una sonda de microfluídica como se describe en el Ejemplo 7A.

20 La FIG. 17 muestra los resultados del agrupamiento ABO inverso utilizando una sonda de microfluídica como se describe en el Ejemplo 7B.

Las FIG. 18A - 18B muestran los resultados de la coincidencia cruzada utilizando una sonda de microfluídica como se describe en el Ejemplo 8. La FIG. 18A es una imagen de los puntos fluorescentes en un portaobjetos de coincidencia cruzada y la FIG. 18B es la intensidad de fluorescencia medida de cada punto.

### **Descripción detallada**

#### 25 **Visión general**

Entre todas las variantes antigénicas de un antígeno de membrana del eritrocito que constituyen los grupos sanguíneos, se han identificado más de treinta sistemas de antígenos de eritrocitos hasta la fecha en seres humanos: el sistema ABO con los antígenos A, B y H, el sistema Rhesus (RH) con los antígenos D en particular (siendo señalada la ausencia del antígeno D como d), C, E, c y e, el sistema de Kell (KEL) con los dos antígenos K y k en particular, el sistema de Duffy (FY) con los antígenos Fy<sup>a</sup> y Fy<sup>b</sup> en particular, el sistema de Kidd (JK) con los antígenos Jk<sup>a</sup> y Jk<sup>b</sup> en particular, o de manera alternativa otros sistemas que se investigan menos comúnmente en la práctica, tales como el sistema MNS, el sistema de Lewis (LE), etc.

30 La transfusión convencional tiene en cuenta en general los grupos del sistema ABO y el sistema Rhesus D (D+ ord). Sin embargo, en las situaciones en las que haya riesgo de aparición atípica de aglutininas, se tienen en cuenta cierto número de otros antígenos del sistema Rhesus y se tienen en cuenta otros sistemas, en particular los antígenos C, c, E y e y Kell, o incluso otros sistemas.

**Anticuerpos dirigidos contra los antígenos eritrocíticos.** Aparte de las situaciones patológicas, tales como en el caso de enfermedades autoinmunitarias, el suero de un individuo puede contener dos tipos de anticuerpos dirigidos contra los antígenos eritrocíticos:

40 (i) Los anticuerpos a los que se hace referencia como típicos (o regulares) y se dirigen contra los antígenos del sistema ABO (por ejemplo, anticuerpo anti-A en un individuo del grupo B). (ii) Los anticuerpos a los que se hace referencia como atípicos (o inmunitarios), cuya presencia en el suero o plasma es circunstancial, y se dirigen más particularmente contra antígenos no del sistema ABO.

45 Los anticuerpos "típicos" o "regulares" son más frecuentemente inmunoglobulinas del isotipo M y/o A que son capaces de aglutinar los glóbulos rojos sanguíneos *in vitro*. Los anticuerpos "atípicos", o "irregulares", o "inmunitarios", son más comúnmente del isotipo G, apareciendo cuando hay una estimulación antigénica por glóbulos rojos sanguíneos ajenos, por ejemplo, después de la inmunización contra uno o más antígenos durante una transfusión de sangre o incluso durante la gestación debido a una inmunorreacción maternal dirigida contra los antígenos eritrocíticos fetales que no pertenezcan al grupo sanguíneo materno, en particular en el momento del parto.

50 Los distintos ensayos que se utilizan en el análisis de la sangre incluyen:  
**Agrupamiento ABO:** Este análisis es el resultado de la combinación y la interpretación de dos tipos de análisis: análisis del suero con el plasma o suero y análisis celulares que utilizan el aglomerado de células sanguíneas

(respectivamente, un agrupamiento inverso y directo).

- En el agrupamiento directo, se ponen en contacto los glóbulos rojos sanguíneos del individuo con anticuerpos de ensayo, teniendo cada uno una especificidad precisa, que se dirigen contra un antígeno del sistema ABO (anticuerpos anti-A, anti-B, anti-AB).
- 5 - En el agrupamiento inverso, el suero o plasma del individuo que contiene los anticuerpos circulantes típicos se pone en contacto con glóbulos rojos sanguíneos fenotipados, perteneciendo cada uno a un grupo antigénico preciso del sistema ABO.

10 **Ensayo de fenotipado:** La técnica que se utiliza normalmente para el fenotipado consiste, en general, en la exploración de la presencia o ausencia del antígeno que está en la superficie del glóbulo rojo sanguíneo que se investiga, utilizando anticuerpos específicos.

15 **Exploración y/o identificación de anticuerpos anti-eritrocíticos atípicos:** Este ensayo se utiliza para detectar la presencia o ausencia, en la sangre de un individuo de anticuerpos dirigidos contra distintos antígenos eritrocíticos. Para esto, se desea demostrar la unión de estos anticuerpos (IgG y/o IgM) a los glóbulos rojos sanguíneos fenotipados, cuyos antígenos se conocen y/o a antígenos recombinantes de grupo sanguíneo. Cuando se unen en los glóbulos rojos sanguíneos o a antígenos recombinantes, estos anticuerpos anti-eritrocíticos atípicos se revelan mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina. En una primera etapa, se hace uso de un panel de "exploración" de glóbulos rojos sanguíneos (dos o tres glóbulos rojos sanguíneos escogidos de manera que comprendan todos los antígenos de importancia en la transfusión para la detección (pero no la identificación) de la presencia o ausencia de anticuerpos atípicos). Cuando la exploración es positiva, la especificidad del anticuerpo o anticuerpos atípicos presentes se identifica entonces mediante al menos un panel de "identificación" de glóbulos rojos sanguíneos, que comprende en general 10 a 15 o incluso 20 glóbulos rojos sanguíneos diferentes fenotipados en la inmensa mayoría de los sistemas de grupos sanguíneos conocidos.

25 **Prueba de compatibilidad cruzada:** El objetivo de este análisis es predecir la compatibilidad del donante-receptor antes de infundir al receptor con la sangre del donante. Esto se utiliza para confirmar la compatibilidad más allá del tipado básico que se hace de la sangre de un donante. Los glóbulos rojos sanguíneos que se originan de un donante potencial se ponen juntos con el suero/plasma del potencial receptor que se va a transfundir. Si la muestra del receptor potencial contiene anticuerpos contra los glóbulos rojos sanguíneos del donante potencial, se revelan con un anticuerpo anti-inmunoglobulina. Dichos resultados del análisis son solo para la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo no hace posible la determinación de la especificidad del mismo. En otro tipo de coincidencia cruzada llamada coincidencia cruzada "menor", el plasma originado del donante potencial se pone junto con los glóbulos rojos sanguíneos del receptor potencial que se va a transfundir. Si la muestra del donante potencial contiene anticuerpos contra los glóbulos rojos sanguíneos del receptor potencial, los anticuerpos se revelan con un anticuerpo anti-inmunoglobulina.

35 **Ensayo antiglobulina directo:** En particular, los recién nacidos o los pacientes que padecen anemia hemolítica o enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, los glóbulos rojos sanguíneos se sensibilizan *in vivo* mediante anticuerpos o/y por fracciones del complemento del suero. Estos anticuerpos o fracciones del complemento del suero activado presentes en la superficie de los eritrocitos sensibilizados *in vivo* son capaces por sí mismos de constituir antígenos que son llevados por los eritrocitos y se detectan directamente mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina y/o un anticuerpo anti-complemento.

40 Se describen en el presente documento sistemas y procedimientos para el análisis de sangre que incluyen los ensayos descritos anteriormente. Los sistemas y procedimientos facilitan la automatización de los análisis de sangre. Los sistemas y procedimientos se pueden utilizar para la detección de agrupamiento y fenotipado, para la exploración y/o identificación de anticuerpos, prueba de compatibilidad cruzada y de antiglobulina directo.

45 Las ventajas de los sistemas y procedimientos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: (1) proporcionar sistemas que sean compactos de tamaño que suministren volúmenes de nanolitros a microlitros de reactivos y muestras de los pacientes; (2) proporcionar sistemas que localicen la reacción química y disminuyan el tiempo de reacción; (3) proporcionar sistemas capaces de llevar a cabo ensayos múltiples (por ejemplo, ensayar las muestras de múltiples pacientes y/o ensayar una única muestra para múltiples análisis); (4) proporcionar sistemas capaces del fenotipado simultáneo (por ejemplo, tipado sanguíneo directo) y exploración/identificación de anticuerpos (por ejemplo, tipado sanguíneo inverso); (5) proporcionar sistemas capaces de depositar glóbulos rojos sanguíneos nativos o hemolizados en un sustrato mientras se mantiene la antigenicidad de los glóbulos rojos sanguíneos nativos o hemolizados; (6) proporcionar sistemas capaces de la coincidencia cruzada de glóbulos rojos sanguíneos que se puedan transfundir en un paciente y/o (7) proporcionar sistemas en los que las etapas de aplicación de la muestra y lavado del material no unido se puedan llevar a cabo simultáneamente lo que a su vez disminuye el tiempo de ensayo.

55 Como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un", "una" y "el" incluyen los referentes en plural a menos de que el contenido dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a un sistema que comprende "un agente de unión" incluye un sistema que comprende uno o más agentes de unión. De la misma manera, la referencia a "una sustancia" incluye una o más sustancias. Como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere al número mencionado y cualquier valor dentro del 10 %

del número mencionado. Así, "aproximadamente 25" se refiere a cualquier valor entre 22,5 y 27,5 incluyendo el 22,5 y el 27,5.

SISTEMAS

5 En referencia a la FIG. 1, se ilustra un sistema 100 para el análisis de sangre. En una realización, el sistema 100 se utiliza para el fenotipado (también conocido como tipado antigénico), para explorar e identificar anticuerpos o para la prueba de compatibilidad cruzada del plasma de un paciente con los glóbulos rojos sanguíneos de un donante. El sistema 100 incluye un sustrato 102, un distribuidor 104 (por ejemplo, una sonda de microfluidica), una fuente lumínica 106 y un detector 108.

10 El sustrato 102 proporciona una superficie en la que el agente de unión 110 (que se muestra en la FIG. 2) se inmoviliza o une. El sustrato 102 es de forma plana en general y se puede estar formado por uno o más materiales que incluyen tereftalato de polietileno (por ejemplo, Mylar), polipropileno, poliestireno, policarbonato, plástico, cristal, silicio, óxido de silicio, y/o metales y óxidos metales simples o funcionalizados con un polímero o grupos activados tales como carboxilo, amina y tosilo. En algunas realizaciones, el sustrato es un portaobjetos formado por uno o más materiales incluyendo el tereftalato de polietileno (por ejemplo, Mylar), polipropileno, poliestireno, policarbonato, plástico, cristal, silicio, óxido de silicio, y/o metales y óxidos de metales simples o funcionalizados con polímeros. El sustrato 102 puede contener micropocillos o nanopocillos. Ejemplos de polímeros con los que funcionalizar la superficie de sustratos formados por metal o un óxido metálico incluye glicidoxipropiltrióxido de silicio, poli-L-lisina, polibreno, polímeros de polietilenglicol, polímeros de dextrano, aminopropilsilano, carboxisilano, hidrogeles y pinceles poliméricos, y/o monocapas auto-ensambladas, por ejemplo, de alquiltioles funcionalizados, dendrímeros u oligonucleótidos. En una realización, el sustrato 102 está revestido con oro. En una realización, el sustrato 102 es una placa de microtitulación que tiene una pluralidad de pocillos en los que se pueden inmovilizar los agentes de unión. En algunas realizaciones, el sustrato 102 es una membrana formada por un material que incluye, por ejemplo, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno, nailon o polisulfona.

25 La superficie del sustrato 102 puede estar húmeda. Es deseable una superficie húmeda en algunas realizaciones en las que los agentes de unión necesitan hidratación para mantenerse activos. Los fluidos ejemplares que se utilizan para humedecer la superficie del sustrato 102 incluyen, pero no se limitan a, un tampón, agua, solución salina, y/o aceite (por ejemplo, aceite mineral).

En algunas realizaciones, el sustrato 102 se monta en una plataforma que se puede mover en la dirección X-Y- y/o Z.

30 En las realizaciones que se ilustran en las FIG. 2-4, uno o más agentes de unión 110 están unidos a una superficie del sustrato 102 en una matriz de líneas. En una realización las líneas tienen una anchura de 25 nm a 500 µm. En ciertas realizaciones las líneas tienen una anchura de 50 nm a 200 µm. En ciertas realizaciones, se unen de 1 a 100 agentes de unión a la superficie del sustrato 102. En una realización, la matriz de líneas abarca la anchura del sustrato 102. En otra realización, la matriz de líneas abarca la longitud del sustrato 102. En algunas realizaciones, uno o más agentes de unión 110 están unidos al sustrato 102 en un patrón de manchas y/o puntos. En una realización las manchas/puntos tienen una anchura de 25 nm a 500 µm. En una realización las manchas/puntos tienen una anchura de 50 µm a 200 µm. En una realización, la matriz de manchas y/o puntos cubre la superficie del sustrato.

En algunas realizaciones, un agente de unión 110 se une a toda la superficie del sustrato 102. Por ejemplo, en una realización en la que el sustrato 102 es un portaobjetos, toda la superficie del portaobjetos puede estar revestida con un agente de unión 110 (por ejemplo, glóbulos rojos sanguíneos o un anticuerpo).

40 Los agentes de unión 110 son capaces de unirse a una o más sustancias en una muestra de sangre (por ejemplo, sangre completa, plasma, suero o muestra de RBC) o una muestra de saliva. En algunas realizaciones, el agente de unión 110 es un anticuerpo contra un antígeno unido a la superficie de un glóbulo rojo sanguíneo o contra inmunoglobulinas humanas y/o contra una fracción de complemento (revestido, por ejemplo, adsorbido sobre los glóbulos rojos sanguíneos) y la sustancia es el antígeno. En algunas realizaciones, el agente de unión es un glóbulo rojo sanguíneo fenotipado nativo o hemolizado y la sustancia es un anticuerpo contra el antígeno unido a la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos. En algunas realizaciones, el agente de unión es una lectina o un anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos universal (por ejemplo, un anticuerpo anti-glicoforina A) y la sustancia son glóbulos rojos sanguíneos.

50 En algunas realizaciones, los anticuerpos utilizados como agentes de unión 110 o las sustancias son inmunoglobulinas que son específicamente reactivos con distintos determinantes antigénicos característicos de grupos sanguíneos particulares. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos IgA, anticuerpos IgM, anticuerpos IgG o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser específicamente reactivos con antígenos de glóbulos rojos sanguíneos que caracterizan los distintos sistemas de grupo sanguíneo mayor y menor. Dichos sistemas de grupos sanguíneos incluyen el sistema ABO, el sistema Rhesus (RH) con los antígenos D en particular (la ausencia de antígeno D se señala como d), C, E, c, e y C, el sistema Kell (KEL) con cuatro antígenos en particular, K, k, Kp<sup>a</sup> y Kp<sup>b</sup>, el sistema de Duffy (FY) con los antígenos Fy<sup>a</sup> y Fy<sup>b</sup> en particular, el sistema de Kidd (JK) con los antígenos Jk<sup>a</sup> y Jk<sup>b</sup> en particular, el sistema MNS con los antígenos M, N, S y s en particular, así como el antígeno P1 del sistema P, el sistema Lutheran con los antígenos Lu<sup>a</sup> y Lu<sup>b</sup> en particular, y el sistema Lewis (LE) con los antígenos Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup> en

particular.

Los anticuerpos pueden ser policlonales y/o monoclonales o una mezcla de fragmentos monoclonales o funcionales de los mismos, que incluyen el dominio de un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab, scFv y nanocuerpos VHH. Un fragmento de anticuerpo funcional puede (i) derivarse de una fuente (por ejemplo un ratón transgénico); o (ii) ser quimérico, en el que el dominio variable se deriva, por ejemplo, de un origen no humano y el dominio constante se deriva, por ejemplo, de un origen humano o (iii) tener injertada una región determinante de complementariedad (CDR), en el que las CDR del dominio variable sean, por ejemplo, de origen no humano, mientras que uno o más regiones marco conservadas del dominio variable sean, por ejemplo, de origen humano y el dominio constante (si acaso) sea, por ejemplo, de origen humano. Los anticuerpos se pueden aislar a partir de una fuente natural, es decir, de organismos vivos o de cultivos celulares o pueden ser anticuerpos completa o parcialmente sintéticos. Un anticuerpo sintético es un anticuerpo que tiene una secuencia derivada, en todo o parte, *in silico* a partir de secuencias sintéticas que se basan en el análisis de secuencias de anticuerpos conocidos. El diseño *in silico* de una secuencia de anticuerpo o fragmento del mismo se puede conseguir, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y se idea una secuencia polipeptídica utilizando los datos obtenidos de esta.

En algunas realizaciones, los glóbulos rojos sanguíneos que se utilizan como agentes de unión 110 son glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos que tienen antígenos de superficie de grupo sanguíneo conocidos. En otras realizaciones, se pueden utilizar glóbulos rojos sanguíneos fenotipados hemolizados o "fantasma" como agentes de unión 110 o sustancias. Los fantasmas son glóbulos rojos sanguíneos que se han hemolizado suavemente y se ha retirado su hemoglobina manteniendo toda su antigenicidad. En algunas realizaciones, se pueden utilizar glóbulos rojos sanguíneos tratados con enzimas como agentes de unión 110. En algunas realizaciones, los antígenos de grupo sanguíneo de la superficie aislados de las membranas se pueden utilizar como agentes de unión 110. En otras realizaciones más, se pueden utilizar antígenos de grupo sanguíneo polipeptídicos y polisacáridicos sintetizados, así como antígenos de grupo sanguíneo recombinantes como agentes de unión 110.

Los agentes de unión 110 pueden depositarse en la superficie del sustrato 102 mediante técnicas tales como el confinamiento fluido hidrodinámico, impresión de chorro de tinta, depósito con pulverizador, micropunteado y/o impresión de microcontacto. Durante o después del depósito, los agentes de unión 110 se pueden inmovilizar en la superficie del sustrato 102 mediante, por ejemplo, atracciones electrostáticas, interacciones de afinidad, interacciones hidrófobas/hidrófilas, o acoplamiento covalente.

En algunas realizaciones, hay regiones del sustrato 102 que no tienen inmovilizados agentes de unión 110 y podrían proporcionar sitios de unión no específicos que se pueden tratar con agentes bloqueantes tales como, por ejemplo, proteína de leche desnatada, caseína, y/o seroalbúmina bovina en un tampón.

En una realización que se ilustra en la FIG. 2 que se puede utilizar para el tipado o fenotipado de antígenos, los agentes de unión 110 inmovilizados en la superficie del sustrato 102 son una matriz de uno o más anticuerpos cada uno contra un antígeno diferente. En algunas realizaciones, se inmovilizan múltiples anticuerpos contra un único antígeno sobre la superficie del sustrato 102. En cada línea vertical se representa un anticuerpo diferente, por ejemplo, anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, anti-C, anti-c, anti-Cw, anti-K, anti-k, anti-Kp<sup>a</sup>, anti-Kp<sup>b</sup>, anti-Fy<sup>a</sup>, anti-Fy<sup>b</sup>, anti-Jk<sup>a</sup>, anti-Jk<sup>b</sup>, anti-Le<sup>a</sup>, anti-Le<sup>b</sup>, anti-P1, anti-M, anti-N, anti-S, anti-s, anti-Lu<sup>a</sup> o anti-Lu<sup>b</sup>.

En una realización que se ilustra en la FIG. 3 que se puede utilizar para la exploración y/o identificación de anticuerpos, los agentes de unión 110 inmovilizados en la superficie del sustrato 102 son una matriz de uno o más glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados, extractos de membrana o/y antígenos recombinantes de grupo sanguíneo. Cada línea vertical representa un glóbulo rojo sanguíneo diferente, por ejemplo, glóbulos rojos sanguíneos RBCI, RBCII, RBCIII... RBCXX.

En una realización que se ilustra en la FIG. 4 que se puede utilizar para el tipado de antígeno y la exploración y/o identificación de anticuerpos (por ejemplo, un ensayo "combo"), más de una matriz de agentes de unión 110 (es decir, una matriz de anticuerpos contra antígenos de los glóbulos rojos sanguíneos y una matriz de glóbulos rojos sanguíneos) también se pueden inmovilizar en el sustrato 102. Por ejemplo, se puede unir una línea vertical de cada anticuerpos anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, anti-C, anti-c, anti-Cw, anti-K, anti-k, anti-Kp<sup>a</sup>, anti-Kp<sup>b</sup>, anti-Fy<sup>a</sup>, anti-Fy<sup>b</sup>, anti-Jk<sup>a</sup>, anti-Jk<sup>b</sup>, anti-Le<sup>a</sup>, anti-Le<sup>b</sup>, anti-P1, anti-M, anti-N, anti-S, anti-s, anti-Lu<sup>a</sup> o anti-Lu<sup>b</sup> a la superficie del sustrato 102 y se puede unir una línea vertical de cada una de los glóbulos rojos sanguíneos RBCI, RB-CII, RBCIII...RBCXX en la superficie del sustrato 102.

En referencia de nuevo a la FIG. 1, el distribuidor 104 se configura para distribuir un volumen de microfluídica o sub-microfluídica de una o más muestras en una vía separada sobre la superficie del sustrato 102. En algunas realizaciones, la vía abarca la longitud del sustrato 102. En algunas realizaciones, la vía abarca la anchura del sustrato 102. En ciertas realizaciones la anchura de la vía es desde 25 nm a 500 µm de ancho. En una realización, el distribuidor 104 también se configura para distribuir uno o más agentes de unión 110 sobre la superficie del sustrato 102.

En algunas realizaciones, el distribuidor 104 se puede mover en la dirección X-Y- y/o Z. El movimiento y funciones del distribuidor 104 pueden controlarse por computadora.

En algunas realizaciones, el distribuidor 104 es un distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico. En una

realización, el distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico es una sonda de microfluídica 200 (o MFP vertical) como se describe en la Solicitud de Patente de EE. UU. 13/881.989, que se incorpora en el presente documento. En una realización que se ilustra en las FIG. 5A y 5B, la sonda de microfluídica 200 puede incluir una capa base 220 en la que se proporcionan los microcanales 223, 224 de procesamiento líquido junto con los microcanales 323, 324 de inmersión en líquido. Cada canal está en comunicación fluida con una abertura 221, 222, 321, 322, localizada cada  
 5 abertura sobre una cara de la capa de base (no necesariamente la misma cara), y preferentemente en estrecha proximidad. Los canales 223, 224, 323, 324, también proporcionan la conexión entre las bombas motorizadas y las aberturas 221, 222, 321, 322. Cuando se mueve la sonda de microfluídica 200 en la vecindad de una superficie, se combinará el líquido de procesamiento proporcionado a través de la abertura 221 con el líquido de inmersión y  
 10 preferentemente se inserta en el líquido de inmersión proporcionado mediante las aberturas 321 y 322, según se simboliza por las flechas curvas (gruesas) de la FIG. 5B. Las últimas se proporcionan para mejor entendimiento, sus dimensiones se han exagerado deliberadamente. A este respecto, el dispositivo se configura preferentemente de manera que se obtenga un flujo laminar. En algunas realizaciones, las dimensiones de la abertura pueden ser de pocas decenas de micrómetros. Las aberturas se pueden entonces separar con un espacio de cincuenta micrómetros o como mucho de cientos a h micrómetros de separación. Como se utilizan en el presente documento pares de canales/aberturas de procesamiento, el líquido de procesamiento se puede re-aspirar a la abertura 222 junto con algo del líquido de inmersión. Nótese que el flujo por la vía entre las aberturas 221 y 222 se puede invertir, es decir, se puede inyectar el líquido de procesamiento desde la abertura 222 mientras que se puede aspirar el líquido por la  
 15 abertura 221. El líquido de procesamiento se localiza esencialmente al lado de las aberturas 221 y 222 y está rodeado por un líquido de inmersión que está presente esencialmente en la vecindad de la cabeza 200. Una capa de revestimiento 210 cierra los canales abiertos sobre la superficie superior de la capa de base, según se representa.

Además, partes de los microcanales del líquido de procesamiento se proporcionan preferentemente como agrupamientos 223', 224' en el espesor de capa de la capa base 220, abiertos sobre la cara superior de la misma. De esta manera, se consigue fácilmente la formación de un microcanal, a pesar de sus dimensiones transversales  
 25 (posiblemente pequeñas, por ejemplo, de unas decenas de micrómetros). Después del ensamblaje, el agrupamiento se encierra en una parte de la capa de revestimiento 210. El agrupamiento se puede grabar directamente sobre la superficie de la capa base 220 mediante una herramienta. Este puede tener cualquier forma de sección apropiada, por ejemplo, redonda, cuadrada, de sección en U o V. La herramienta necesaria se escoge normalmente de acuerdo con el material de la capa base 220. En una variante se puede contemplar la ablación con láser. Más ventajosamente aún, se utiliza un grabado iónico reactivo profundo (DRIE) para la fabricación de microcanales.

Como se representa en la FIG. 5B, los agrupamientos 223', 224' se extienden hasta las respectivas aberturas 221, 222. De manera similar, los canales de inmersión 223, 224 alcanzan las aberturas respectivas 321, 324. En este ejemplo, los canales y aberturas se disponen simétricamente alrededor del eje principal de la cara superior de la cabeza. Una abertura se forma directamente al final del agrupamiento a nivel del extremo 310 de la cara frontal 320  
 35 de la capa de base 220, que de nuevo aquí se fabrica fácilmente. Dicho extremo frontal 320 se fabrica normalmente agudo, lo que permite el depósito de líquido compacto en una superficie de interés, y deja cubículos para la monitorización óptica fácil.

En referencia a la Figura 5A, las vías 211, 212 se proporcionan en la capa de revestimiento 210. Se muestra una vía 311 adicional, que permite la transmisión de una comunicación fluida a los canales de inmersión 323, 324 (solo se proporciona aquí una vía, que alimenta ambos canales de inmersión). Los puertos de tubos correspondientes conectados con las vías se pueden proporcionar (no mostrado). Los canales tienen extremos dispuestos de manera que están frente a las vías.

Como se representa en las FIG. 5A y 5B la sonda de microfluídica 200 incluye dos microcanales de procesamiento líquido. En algunas realizaciones, la sonda de microfluídica 200 incluye más de dos microcanales de líquido de procesamiento. En algunas realizaciones, la sonda de microfluídica 200 puede incluir 2 a 50 microcanales de líquido de procesamiento (véase la FIG. 11). En algunas realizaciones, la sonda de microfluídica 200 puede incluir un elemento de calentamiento en al menos uno de los microcanales de líquido de procesamiento. El calentamiento de la muestra puede aumentar la velocidad a la que los antígenos y anticuerpos reaccionan lo que puede reducir el tiempo del ensayo.

Los líquidos de procesamiento ejemplares incluyen un tampón, sangre completa, RBC, plasma, suero, o aceite (por ejemplo, aceite mineral). Los líquidos de inmersión ejemplares incluyen aceite mineral, tampón, agua y/o solución salina.

En algunas realizaciones, la sonda de microfluídica incluye estructuras para la separación de plasma de los glóbulos rojos sanguíneos en una muestra de sangre completa. En algunas realizaciones, la separación se puede conseguir mediante el tamaño y/o por fuerzas capilares. La FIG. 6 ilustra una realización de una sonda de microfluídica 600 que tienen al menos dos microcanales de líquido de procesamiento de diferentes dimensiones. La sonda se configura de manera que se puede utilizar con muestras de sangre completa o con muestras que contienen los RBC (es decir, RBC en plasma) sin coágulos. Se dimensiona un primer microcanal 602 para excluir los glóbulos rojos sanguíneos en una muestra de sangre completa. Se dimensiona un segundo microcanal 604 para que permita el flujo a su través de los glóbulos rojos sanguíneos de una muestra. En una realización en la que los microcanales de líquido de procesamiento tienen una sección transversal circular, el primer microcanal 602 tiene un diámetro menor de 6 micrómetros. En

- 5 algunas realizaciones, el diámetro del primer microcanal es menor de 4 micrómetros o menor de 2 micrómetros o menor de 1-2 micrómetros. En algunas realizaciones, el segundo microcanal 604 tiene un diámetro mayor de aproximadamente 7 micrómetros. El diámetro de los glóbulos rojos sanguíneos es de aproximadamente 6-8 micrómetros. Teniendo un diámetro mayor, el segundo microcanal 604 permitirá que los glóbulos rojos sanguíneos fluyan a su través. La sección transversal del microcanal puede ser de cualquier forma apropiada incluyendo circular, oval y elíptica. En algunas realizaciones, las superficies internas de los microcanales de líquido de procesamiento 602 y 604 puede revestirse con un material, por ejemplo, heparina, que evite que los componentes sanguíneos se unan a las superficies internas. La muestra de sangre completa también puede llevar un anticoagulante como, por ejemplo, heparina, citrato, o EDTA para evitar que se coagule la sangre.
- 10 La FIG. 7 ilustra una realización de una sonda de microfluidica 700 que tienen un microcanal 702 tortuoso en comunicación fluida con una primera abertura 704. El diámetro del canal 702 tortuoso se dimensiona para retener los RBC de la muestra de sangre completa. Unas ramas 706 capilares de diámetro más pequeño salen del microcanal 702 tortuoso y están en comunicación fluida con una segunda abertura 708. Los capilares 706 permiten que el plasma libre de glóbulos rojos sanguíneos fluya a su través.
- 15 Las sondas de microfluidica se pueden formar con material que sea compatible con los fluidos que fluyen a través de los canales. Los materiales compatibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a, silicio, sílice, polidimetilsiloxano (PDMS), arseniuro de galio, cristal, cerámica, cuarzo, polímeros tales como neopreno, Teflon™, elastómeros de polietileno, polibutadieno/SBR, nitritos, nailon, y/o metales. La superficie interna de los canales se puede revestir también con material adecuado para reducir la afinidad entre los componentes fluidos y los propios canales.
- 20 En referencia de nuevo a la FIG. 1, la fuente lumínica 106 es configura para radiar la superficie del sustrato 102. Dependiendo de la señal que se va a detectar, la fuente lumínica 106 puede proporcionar una luz que varía desde el intervalo visible hasta cerca del intervalo infrarrojo. Las fuentes lumínicas ejemplares incluyen láseres y diodos emisores de luz.
- 25 El detector 108 se configura para detectar la luz emitida desde la superficie del sustrato 102. En algunas realizaciones, la detección se consigue mediante detección colorimétrica, fluorescente o luminiscente. En algunas realizaciones, la detección se consigue mediante creación de imágenes tales como por fotografía o por detectores electrónicos. Los detectores electrónicos ejemplares incluyen los fotodiodos, detectores de dispositivo acoplado a carga (CCD), o detectores de semiconductores de óxido metálico complementario (CMOS).
- 30 La señal análoga del detector 108 se digitaliza mediante un convertidor digital a analógico 110. La señal digitalizada se procesa por un microprocesador 112 para obtener al menos un valor o intensidad de luz detectada que se almacena en la memoria 114 y/o se presenta en una pantalla opcional 116.
- 35 Utilizando la electrónica y software apropiados, el sistema 100 se puede programar para saber la identidad y localización de las sustancias específicas unidas a los agentes de unión 110 sobre la superficie del sustrato 102. La identidad y localización de las sustancias pueden correlacionarse con señales generadas de manera que se puede determinar un grupo sanguíneo y ser identificado por el ensayador. Adicionalmente, se puede incluir un software estadístico de manera que se combine y formule los resultados de las distintas repeticiones y/o diluciones de los agentes de unión 110 proporcionados en el sustrato 102. De esta manera, las señales obtenidas de una multiplicidad de sustancias pueden procesarse en conjunto y se presenta un resultado estadísticamente significativo al ensayador.

#### PROCEDIMIENTOS

- 40 El sistema 100 se puede utilizar para llevar a cabo el tipado de antígenos, exploración/identificación de anticuerpos, tipado de antígenos combinado y prueba de compatibilidad cruzada. Adicionalmente, el sistema 100 se utiliza para la detección del grupo y fenotipado, exploración y/o identificación de anticuerpos, prueba de compatibilidad cruzada y ensayo de antiglobulina directo.
- 45 En referencia a la FIG. 8, se describirá ahora un procedimiento 800 para el tipado de antígenos y/o exploración y/o identificación de anticuerpos. El procedimiento 800, por ejemplo, se puede ejecutar con el sistema mencionado anteriormente que se ilustra en la FIG. 1.
- 50 En la etapa ejemplar 810, se aplica una muestra en un sustrato 102 húmedo o seco que tiene uno o más agentes de unión 110 inmovilizados en este, en el que uno o más agentes de unión 110 son capaces de unirse a una o más sustancias de la muestra. En una realización de tipado de antígenos que se muestra en la FIG. 2, la muestra y la sustancia son RBC del paciente o el donante tratados o no tratados por enzimas y los agentes de unión 110 inmovilizados en la superficie del sustrato 102 son anticuerpos contra los antígenos de los glóbulos rojos sanguíneos (RBC). La muestra de RBC se puede proporcionar separando la sangre completa en RBC y plasma mediante, por ejemplo, centrifugación. Los RBC resultantes se pueden utilizar "tal cual" o se pueden diluir. En algunas realizaciones, los RBC se diluyen de un 0,1 a un 50 %. En algunas realizaciones, los RBC se diluyen entre un 0,5 - 20 %. En ciertas realizaciones, los RBC se diluyen entre un 0,6 - 5 %. En algunas realizaciones, los RBC se diluyen más de un 50 %.
- 55 En una realización de exploración y/o identificación de anticuerpos que se muestra en la FIG. 3, la muestra es plasma del paciente o el donante, los agentes de unión 110 inmovilizados sobre la superficie del sustrato 102 son RBC

fenotipados nativos o hemolizados, antígenos de grupo sanguíneo polisacarídicos naturales o sintéticos, polipeptídicos sintetizados químicamente, o antígenos de grupo sanguíneo recombinantes y la una o más sustancias son anticuerpos contra los antígenos de los RBC, los antígenos de glóbulos rojos sanguíneos recombinantes o extractos de membrana de glóbulos rojos sanguíneos.

5 En una realización que se muestra en la FIG. 4, la realización de tipado de antígenos que se muestra en la FIG. 2, se combina con la realización de exploración y/o identificación de anticuerpos que se muestra en la FIG. 3. En esta realización (por ejemplo, un ensayo "combo"), una primera parte del sustrato tiene inmovilizados RBC fenotipados que pueden ser nativos o hemolizados y una segunda parte tiene inmovilizados anticuerpos contra los antígenos de los RBC.

10 En una realización, se aplican una o más muestras con una o más sondas de microfluídica. En otra realización, se utiliza una sonda de microfluídica para cada muestra (FIG. 2-3). Cada muestra se aplica en el sustrato 102 revestido con agentes de unión 110 en una dirección perpendicular a la línea de agentes de unión 110, de manera que la muestra se aplica en cada uno de los agentes de unión 110 que revisten el sustrato 102. En otra realización más, se conecta una matriz de sondas en paralelo, la matriz de sondas 900, a la misma o diferentes muestras (FIG. 9-10). La matriz de sondas 900 aplica la misma o diferentes muestras en todos los agentes de unión 110 a la vez. Para una nueva muestra, los canales en la matriz de sondas 900, se aclara, por ejemplo, para retirar la primera muestra, la matriz de sondas 900 se mueve junto con otro conjunto de agentes de unión 110 y se aplica la nueva muestra en el nuevo conjunto de agentes de unión 110. Para cada nueva muestra, el procedimiento de aclarado y movimiento de la matriz de sondas 900 se repite. En algunas realizaciones, se utiliza una pluralidad de matrices de sondas 900 para ensayar múltiples muestras cada una contra múltiples agentes de unión 110 a la vez.

20 En una realización que se muestra en la FIG. 11, la sonda de microfluídica 1100 incluye una pluralidad de microcanales de líquido de procesamiento. La pluralidad de microcanales de líquido de procesamiento se puede utilizar para depositar una o más muestras (es decir, la misma o diferentes muestras) y/o agentes de unión 110 en la superficie del sustrato 102. En algunas realizaciones, la sonda de microfluídica incluye de 2 - 100 microcanales de líquido de procesamiento. En otras realizaciones, cada una de las sondas de las matrices de sondas 900 (que se muestran en las FIG. 9-10) incluye una pluralidad de microcanales. En una realización de ensayo "combo", la sonda de microfluídica 600 se muestra en la FIG. 6 se utiliza para depositar una o más muestras en la realización que se muestra en la FIG. 4, en la que una primera parte del sustrato tiene inmovilizados RBC fenotipados que pueden ser nativos o hemolizados, y una segunda parte tiene inmovilizados anticuerpos contra los antígenos de los RBC.

30 En la etapa 820 ejemplar, el material no unido, por ejemplo, los glóbulos rojos sanguíneos y/o anticuerpos, se retiran de al menos una parte del sustrato 102 que tiene inmovilizado un agente de unión en él. El material no unido puede retirarse lavando la superficie del sustrato 102 con, por ejemplo, un tampón, agua o solución salina. En una realización, se puede utilizar una sonda de microfluídica para retirar el material no unido coincidente con la etapa 810 bombeando una solución de lavado (por ejemplo, un líquido de inmersión) mediante uno o más microcanales de líquido de procesamiento.

35 En la etapa 830 ejemplar las sustancias unidas al uno o más agentes de unión 110 inmovilizados en el sustrato 102 se detectan y se identifican las sustancias presentes en la muestra. También puede determinarse la ausencia de sustancias unidas a los agentes de unión. En la realización de tipado antigénico, el color rojo de los RBC unidos a los anticuerpos contra RBC se puede detectar visualmente o de manera espectrométrica. Los RBC unidos a los anticuerpos contra RBC también se pueden detectar mediante detección de marcado secundario incluyendo, por ejemplo, anticuerpos conjugados colorimétricos, fluorescentes o quimioluminiscentes. En una realización de exploración y/o identificación de anticuerpos, los anticuerpos unidos a los antígenos contra RBC pueden detectarse mediante detección por marcado secundario específico.

40 En referencia a la FIG. 12, un procedimiento 1200 para la prueba de compatibilidad cruzada se describirá ahora en el que se utiliza una sonda de microfluídica para depositar glóbulos rojos sanguíneos del donante y plasma del paciente. Este procedimiento ensaya la compatibilidad de los RBC de un donante con el plasma de un paciente. El procedimiento 1200, por ejemplo, se puede ejecutar con el sistema mencionado anteriormente que se ilustra en la FIG. 1.

45 En la etapa ejemplar 1210, se aplican glóbulos rojos sanguíneos de un donante sobre una superficie húmeda pretratada de un sustrato con la sonda de microfluídica. Los glóbulos rojos sanguíneos del donante pueden ser nativos o hemolizados. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos sanguíneos del donante también se fenotipan. En algunas realizaciones, estos RBC se aplican en la superficie del sustrato en un líquido de inmersión para mantener la antigenicidad de los glóbulos rojos sanguíneos. En algunas realizaciones, la superficie del sustrato se pretrata con agentes de unión tales como, por ejemplo, lectinas, agentes químicos, o anticuerpos anti-RBC universales tales como, por ejemplo, el anticuerpo A anti-glicoforina.

50 En la etapa ejemplar 1220, se retiran los glóbulos rojos sanguíneos no unidos lavando la superficie del sustrato 102, por ejemplo, con un tampón, agua o solución salina. En una realización, se puede utilizar una sonda de microfluídica para retirar los glóbulos rojos sanguíneos del donante no unidos coincidentes con la etapa 1210 bombeando una solución de lavado (de inmersión) a través de uno o más microcanales de líquido de procesamiento.

En la etapa ejemplar 1230, se deposita el plasma de un paciente sobre los RBC del donante que se aplicaron en la superficie del sustrato pretratado en la etapa 1210. En una realización, se utiliza la misma sonda de la etapa 1210 para depositar el plasma del paciente. Se puede utilizar el mismo microcanal o un microcanal diferente que en la etapa 1210 para depositar el plasma del paciente. Si se utiliza el mismo microcanal que en la etapa 1210, el microcanal se puede aclarar, por ejemplo, con un tampón entre los usos o se puede utilizar un "tiro" de tampón, aceite o aire para separar los RBC del donante de la muestra del paciente. En otra realización, se utiliza una sonda de microfluídica diferente entre esta etapa y la etapa 1210 para evitar la contaminación cruzada.

En la etapa ejemplar 1240, se retiran los anticuerpos no unidos de la muestra de plasma del paciente lavando la superficie del sustrato 102, por ejemplo, con tampón, agua o solución salina. En una realización, se puede utilizar una sonda de microfluídica para retirar los anticuerpos no unidos en la etapa 1230 bombeando una solución de lavado a través de uno o más microcanales de líquido de procesamiento.

En la etapa ejemplar 1250, en respuesta a la detección de un anticuerpo unido a los glóbulos rojos sanguíneos del donante, se detecta el anticuerpo presente en el plasma del paciente (por ejemplo, mediante un anticuerpo secundario marcado) y en respuesta a la no detección del anticuerpo unido a los glóbulos rojos sanguíneos del donante, se determina que el anticuerpo está ausente en el plasma del paciente.

En otro procedimiento de compatibilidad cruzada (por ejemplo, un procedimiento de compatibilidad cruzada menor), se utiliza una sonda de microfluídica para depositar RBC del paciente y plasma del donante. Este procedimiento ensaya la compatibilidad del plasma del paciente con las RBC del donante y es importante en la situación en la que se transfunde sangre completa al paciente más que solo RBC o cuando una cantidad médicamente relevante de plasma del donante se mantiene en los RBC separados que se transfunden al paciente. El procedimiento de compatibilidad cruzada menor se puede ejecutar, por ejemplo, con el sistema mencionado anteriormente que se ilustra en la FIG. 1.

Una ventaja de la sonda de microfluídica es su capacidad para depositar en un líquido de inmersión fisiológico que permita el mantenimiento de la antigenicidad de los glóbulos rojos sanguíneos. Esto proporciona posibles usos adicionales para la sonda. En algunas realizaciones, un sistema de tipado de sangre incluye un sustrato que tiene inmovilizados uno o más agentes de unión en localizaciones diferentes, en el que el uno o más agentes de unión son capaces de unirse a glóbulos rojos sanguíneos nativos o hemolizados; un distribuidor configurado para distribuir estos glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados en el sustrato y retirar los glóbulos rojos sanguíneos no unidos del sustrato; un distribuidor configurado para depositar una muestra de plasma del paciente sobre los glóbulos rojos sanguíneos aplicados a la superficie y para retirar los anticuerpos no unidos y un detector que se configura para detectar anticuerpos. La prueba de compatibilidad cruzada descrita previamente es un ejemplo.

La exploración de anticuerpos es otro ejemplo. Los RBC fenotipados se depositan mediante la sonda sobre una superficie pretratada como en la prueba de compatibilidad cruzada. Se aplica un lavado y luego se depositan los anticuerpos que contiene el plasma y se identifican.

## 35 Ejemplos

### Ejemplo 1: Tipado de antígenos

El objetivo de este análisis es identificar, mediante anticuerpos monoclonales o policlonales específicos, los antígenos de grupo sanguíneo presentes en la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos de donantes o pacientes (grupos ABO, RH, Kell, Duffy, Kidd, Lewis).

40 Con el fin de demostrar la posibilidad de la determinación del grupo/fenotipado de los glóbulos rojos sanguíneos con la tecnología de la invención, se utilizó la superficie del sustrato 102 para inmovilizar los anticuerpos anti-glóbulos rojos sanguíneos y se utilizó una sonda de microfluídica 200 para distribuir los glóbulos rojos sanguíneos del paciente o la muestra de sangre completa y para retirar los glóbulos rojos sanguíneos no unidos. El color rojo de los RBC unidos a los anticuerpos anti-eritrocitos se detectó entonces visualmente.

### 45 1.1 - Material

En este ejemplo, los agentes de unión 110 son anticuerpos anti-eritrocitos. La superficie del sustrato 102 son placas de poliestireno de 96 pocillos con el fondo plano. Los anticuerpos se depositaron con una impresora de chorro de tinta o de contacto como puntos sobre el fondo de los pocillos. Cada pocillo contenía al menos un punto de cada anticuerpo específico. En este ejemplo, se diluyeron los anticuerpos en tampón PBS (pH 7,4) a una concentración que varía de 10 a 500 µg/ml y se unieron a la superficie del sustrato 102 por absorción pasiva. Después de depositar los anticuerpos en la superficie, el sustrato se saturó mediante el contacto con PBS suplementado con un 1 % de BSA para evitar la unión no específica de los componentes de la muestra y se secó posteriormente al aire.

En este ejemplo, los anticuerpos utilizados eran:

- IgM anti-A clon 15750F7 (Bio-Rad)

- IgG anti-D clon BRAD3 (IBGRL)
- IgM anti-A clon MID11G4 (Bio-Rad)

## 1.2 - Descripción del ensayo

5 Con el fin de demostrar la fiabilidad y verificar la especificidad de la determinación del grupo de acuerdo con la tecnología, cada punto se ensayó individualmente. Se distribuyó un tampón adecuado (líquido de procesamiento) en los pocillos con el fin de cubrir la superficie completa del pocillo. Entonces se posicionó la sonda de microfluídica encima del punto de anticuerpo. En una primera etapa, se hace fluir una suspensión de RBC o sangre completa sobre el punto para poner en contacto los RBC con los anticuerpos. En una segunda etapa, el flujo se cambia a un tampón de lavado con el fin de retirar los RBC no unidos. Al final se detecta la presencia o ausencia de glóbulos rojos sanguíneos unidos al anticuerpo aplicado puntualmente de manera visual o espectrométrica.

### Ejemplo 2: Exploración/identificación de anticuerpos

15 Con el fin de demostrar la posibilidad de la exploración e identificación de anticuerpos con la tecnología de la invención, se utilizó la superficie del sustrato 102 para inmovilizar glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados mediante poli-L-lisina (PLL). Para esta aplicación, se diseñó una sonda de microfluídica 200 para llevar a cabo el calentamiento y la química secuencial. La sonda se utilizó para depositar la muestra de plasma, suero o sangre completa del paciente, retirar los anticuerpos no específicos y distribuir un conjugado de anticuerpo anti-Fc marcado para detectar los anticuerpos unidos.

## 2.1 - Material y reactivos

### 2.1.1. Sensibilización de la superficie del sustrato 102 con PLL

20 En este ejemplo, la superficie del sustrato 102 son placas de poliestireno de 96 pocillos con el fondo plano. Se distribuyeron en cada pocillo 25 µg/ml de PLL de peso molecular 70 000-130 000 en PBS, pH 7,4 y se incubaron durante 18 h a temperatura ambiente. Al final de esta etapa, se lavaron los pocillos con PBS pH 7,4 suplementado con un 0,05 % de Tween®-20 y luego se utilizó para inmovilizar las células.

### 2.1.2. Inmovilización de células en la superficie

25 En este ejemplo, los agentes de unión 110 son glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados. Las células se depositaron con una impresora de chorro de tinta o de contacto como puntos sobre el fondo de los pocillos revestidos con PLL. Cada pocillo contenía al menos un punto de cada fenotipo. En este ejemplo, las suspensiones celulares eran del 20 al 50 % en tampón suplementado con un componente conservante. Tras el depósito, el sustrato se lavó para retirar las células no unidas y luego se saturó mediante el contacto con PBS suplementado con un 1 % de BSA y 1 M de dextrosa para evitar la unión no específica de los componentes de la muestra y la conservación de las células. Después de una incubación durante una noche, se retiró el tampón de saturación y se secó la superficie al aire.

En este ejemplo, los agentes de unión que se utilizaron son los tres glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados que se utilizan normalmente para la exploración de anticuerpos.

## 35 2.2. Descripción del ensayo

Cada punto de células se ensayó individualmente. Se distribuyó un tampón adecuado (líquido de procesamiento) en los pocillos con el fin de cubrir la superficie completa del pocillo. Entonces se posicionó la sonda de microfluídica encima del punto. En una primera etapa, se hace fluir el plasma, suero o sangre completa del paciente sobre el punto para poner en contacto la muestra y los RBC. La sonda se configura para calentar el área de la reacción a 37 °C. En una segunda etapa, se aplica el procedimiento secuencial de: lavado con el fin de retirar los anticuerpos no específicos, distribución de un conjugado de anticuerpo anti-Fc marcado y un lavado final para retirar el anticuerpo antiglobulina marcado no unido. Al final, se detecta la presencia o ausencia de anticuerpo unido a los glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados mediante técnicas colorimétricas, fluorescentes o luminiscentes.

### Ejemplo 3: Prueba de compatibilidad cruzada

45 Con el fin de demostrar la posibilidad de llevar a cabo la prueba de compatibilidad cruzada con la tecnología de la invención, se utilizó la sonda de microfluídica 200 para llevar a cabo todas las etapas desde la inmovilización de los glóbulos rojos sanguíneos del donante mediante poli-L-lisina (PLL) hasta la reacción de detección final. Se diseñó esta sonda de microfluídica 200 para llevar a cabo el calentamiento y la química secuencial. La sonda también se utilizó para depositar la muestra de plasma, suero o sangre completa del paciente y retirar los anticuerpos no específicos. Se utilizó un conjugado de anticuerpo anti-Fc marcado para detectar los anticuerpos unidos.

## 3.1 - Material y reactivos

### 3.1.1. Sensibilización de la superficie del sustrato 102 con PLL

En este ejemplo, la superficie del sustrato 102 son placas de poliestireno de 96 pocillos con el fondo plano. Se distribuyeron en cada pocillo 25 µg/ml de PLL de peso molecular 70 000-130 000 en PBS, pH 7,4 y se incubaron durante 18 h a temperatura ambiente. Al final de esta etapa, se lavaron los pocillos con PBS pH 7,4 suplementado con un 0,05 % de Tween®-20 y luego se utilizó para inmovilizar las células.

5 **3.1.2. Descripción del ensayo**

Se distribuyó un tampón adecuado (líquido de procesamiento) en los pocillos revestidos con PLL con el fin de cubrir la superficie completa del pocillo. La sonda de microfluidica 200 se posicionó entonces sobre la superficie y se aplicó el procedimiento secuencial de: depósito de los glóbulos rojos sanguíneos del donante prelavados, etapa de lavado para retirar las células no unidas, flujo del plasma, suero, o sangre completa del paciente a 37 °C, lavado para retirar los anticuerpos no específicos, distribución del conjugado de anticuerpo anti-Fc marcado y un lavado final para retirar el anticuerpo antiglobulina marcado no unido. Al final, se detecta la presencia o ausencia de anticuerpo unido a los glóbulos rojos sanguíneos del donante mediante técnicas colorimétricas, fluorescentes o luminiscentes.

**Ejemplo 4: Ensayo de antiglobulina directo**

15 El objetivo de este análisis es identificar mediante anticuerpos monoclonales o policlonales específicos, las IgG y/o fracción de complemento C3d revestidos sobre RBC sensibilizados *in vivo*.

Con el fin de demostrar la posibilidad de detectar los RBC sensibilizados con la tecnología de la invención, se utilizó la superficie del sustrato 102 para inmovilizar los anticuerpos anti-IgG y anti-C3d. Se utilizó una sonda de microfluidica 200 para distribuir los glóbulos rojos sanguíneos del paciente prelavados y para retirar los glóbulos rojos sanguíneos no unidos. El color rojo de los RBC unidos a los anticuerpos específicos se detectó entonces visualmente.

20 **4.1 - Material**

En este ejemplo, los agentes de unión 110 son anticuerpos anti-IgG y anti-C3d. La superficie del sustrato 102 son placas de poliestireno de 96 pocillos con el fondo plano. Los anticuerpos se depositaron con una impresora de chorro de tinta o de contacto como puntos sobre el fondo de los pocillos. Cada pocillo contenía al menos un punto de cada anticuerpo específico. En este ejemplo, se diluyeron los anticuerpos en tampón PBS (pH 7,4) a una concentración que varía de 10 a 500 µg/ml y se unieron a la superficie del sustrato 102 por absorción pasiva. Después de depositar los anticuerpos en la superficie, el sustrato se saturó mediante el contacto con PBS suplementado con un 1 % de BSA para evitar la unión no específica de los componentes de la muestra y se secó posteriormente al aire.

En este ejemplo, los anticuerpos utilizados eran:

- Anti-IgG humana policlonal de conejo (Bio-Rad)
- 30 - Anti-C3d clon 053A714 (Bio-Rad)

**4.2 - Descripción del ensayo**

Con el fin de demostrar la fiabilidad y verificar la especificidad del ensayo, se llevaron a cabo las reacciones de una manera unitaria. En este caso, cada punto se ensayó individualmente. Se distribuyó un tampón adecuado (líquido de procesamiento) en los pocillos con el fin de cubrir la superficie completa del pocillo. Entonces se posicionó la sonda de microfluidica encima del punto de anticuerpo. En una primera etapa, se hace fluir una suspensión de RBC sobre el punto para poner en contacto los RBC con los anticuerpos. En una segunda etapa, el flujo se cambia a un tampón de lavado con el fin de retirar los RBC no unidos. Al final se detecta la presencia o ausencia de glóbulos rojos sanguíneos unidos al anticuerpo aplicado puntualmente de manera visual o espectrométrica.

**Ejemplo 5: Tipado de antígenos - fenotipado/determinación del grupo singleplex y multiplex**

40 El objetivo de este análisis era identificar, utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales específicos, los antígenos de grupo sanguíneo presentes en la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos de donantes o pacientes (grupos ABO, RH, Kell, Duffy, Kidd, Lewis).

Para demostrar la posibilidad del fenotipado/ determinación del grupo de glóbulos rojos sanguíneos con la tecnología de la invención, se inmovilizó un anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos sobre la superficie del sustrato y se utilizó una sonda de microfluidica para distribuir los glóbulos rojos sanguíneos del paciente junto con la retirada de los glóbulos rojos sanguíneos no unidos. El color rojo de los glóbulos rojos sanguíneos unidos a los anticuerpos anti-eritrocíticos se detectó entonces visualmente y se utilizó para determinar las especificidades antigénicas.

**A. Determinación del grupo singleplex de glóbulos rojos sanguíneos A positivos**

**Materiales**

50 En este ejemplo, el agente de unión era un anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos, y más particularmente un mAb IgM murino anti-A (Bio-Rad clon 15750F7). Para este experimento y todos los experimentos posteriores el sustrato era un portaobjetos de poliestireno (TED PELLA, INC.; producto n.º 260225). El anticuerpo se depositó con una

impresora de chorro de tinta y se hicieron filas de puntos sobre el portaobjetos. Cada punto estaba claramente identificado por sus coordenadas X e Y. El tamaño del punto era aproximadamente de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los puntos se alinearon entre ellos y se espaciaron separados unos 50 a 60  $\mu\text{m}$ . El anticuerpo IgM anti-A purificado se diluyó en tampón PBS (pH 7,4) a una concentración que variaba de 10 a 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se unió a la superficie del sustrato 102 por absorción pasiva. Después de depositar el anticuerpo en la superficie, el sustrato se trató con un 1 % de BSA en PBS para evitar la unión no específica de los componentes de la muestra. Los portaobjetos preparados de esta manera se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. La sonda que se utilizó en este y los ejemplos posteriores era una sonda con 4 canales, con unas dimensiones de cada uno de 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$ . Para obtener un confinamiento de flujo hidrodinámico, el canal 2 se utilizó para distribuir la muestra y los canales 1 y 3 se utilizaron para aspirar la muestra. Se utilizaron como muestras suspensiones de glóbulos rojos sanguíneos que tenían diferentes fenotipos (glóbulos rojos sanguíneos A positivos y O positivos).

### Procedimiento

Para demostrar la fiabilidad y verificar la especificidad, así como la reproductibilidad de la determinación del grupo de acuerdo con la tecnología, se ensayó cada punto uno tras otro con la misma solución de glóbulos rojos sanguíneos (por ejemplo, dos glóbulos rojos sanguíneos A positivo, así como dos glóbulos rojos sanguíneos A negativo (glóbulos rojos sanguíneos O)). En este ejemplo, los glóbulos rojos sanguíneos se lavaron en solución salina isotónica al 0,9 % y se suspendieron al 50 % en agua fisiológica. Con el canal 2 de la sonda de microfluídica, se aspiraron 2  $\mu\text{l}$  de la suspensión de glóbulos rojos sanguíneos diluidos a 1,6  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Para humedecer el portaobjetos, se distribuyó suficiente tampón (líquido de procesamiento) en el portaobjetos para cubrir la superficie completa. La sonda de microfluídica se posicionó entonces sobre el portaobjetos y se estableció entonces el confinamiento de flujo hidrodinámico. Cuando se estabilizó el confinamiento de flujo hidrodinámico, se programó el movimiento de la sonda de microfluídica para moverse a una velocidad de 0,02 mm/s y para seguir una línea recta pasando a lo largo de los puntos alineados. Durante el movimiento de la sonda, los glóbulos rojos sanguíneos distribuidos se ponían en contacto con la superficie saturada del sustrato 102 o se ponían en contacto con el anticuerpo aplicado puntualmente. Los glóbulos rojos sanguíneos que tenían la especificidad antigénica correcta se unían inmediatamente a los anticuerpos inmovilizados. Debido al depósito y aspiración continuos de las células y tampón de fluido de procesamiento, los glóbulos rojos sanguíneos no unidos se retiraban de manera concurrente con la unión de los glóbulos rojos sanguíneos. Después del depósito/aspiración de los glóbulos rojos sanguíneos, la presencia o ausencia de glóbulos rojos sanguíneos unidos al anticuerpo aplicado de manera puntual se detectó mediante captura de imágenes con una cámara. Conociendo la posición de cada punto sobre el sustrato, era posible confirmar si estaban presentes los antígenos en la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos que se estaban ensayando, y por lo tanto identificar la especificidad del grupo sanguíneo en los glóbulos rojos sanguíneos que se estaban ensayando.

Para determinar si los antígenos estaban presentes en la superficie de RBC A positivos y A negativos, se ensayaron dos glóbulos rojos sanguíneos A positivos y dos glóbulos rojos sanguíneos A negativos depositando los RBC sobre 20 puntos. Los resultados del ensayo para los 20 puntos que tenían glóbulos rojos sanguíneos A positivos se muestran en la FIG. 13A. Se muestra una vista ampliada del cuarto punto en la FIG. 13B. Los glóbulos rojos sanguíneos A positivos se unían fuertemente a toda la superficie del punto, mientras que los glóbulos rojos sanguíneos A negativos no se unían para nada (no mostrado). Estos resultados demuestran que la unión que se observa es específica: la unión con el glóbulo rojo sanguíneo solo se produce cuando está implicado un par antígeno-anticuerpo. Los resultados también demuestran que los glóbulos rojos sanguíneos A positivos pueden distinguirse claramente de los glóbulos rojos sanguíneos A negativos de manera que se puede identificar el antígeno A de la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos. De manera adicional, estos resultados muestran que la sonda de microfluídica puede utilizarse en un procedimiento de tipado de antígeno singleplex en el que se utiliza una sonda de microfluídica para aplicar RBC a anticuerpos anti-glóbulos rojos sanguíneos sobre un sustrato sólido mientras que se retiran de manera concurrente los RBC no unidos.

El solicitante también ha descubierto que cuando se evaluaban glóbulos rojos sanguíneos con una densidad de antígeno menor, la superficie cubierta por los glóbulos rojos sanguíneos era menos densa.

### **B. Determinación del grupo multiplex de glóbulos rojos sanguíneos A y D positivos**

En este ejemplo, se utilizó la misma alícuota de glóbulos rojos sanguíneos (y por lo tanto menos muestra) para hacerlos reaccionar de manera separada con un anticuerpo monoclonal (mAb) murino IgM anti-A, así como un MAb humano IgG anti-D inmovilizados.

### Materiales

Los agentes de unión eran los anticuerpos anti-glóbulos rojos sanguíneos: mAb murino IgM anti-A (clon 157 50 F7) e IgG humana anti-D (clon Brad3). Los anticuerpos se depositaron manualmente como puntos sobre el portaobjetos de poliestireno. Cada punto estaba claramente identificado por sus coordenadas X e Y. En este caso, el tamaño del punto era de aproximadamente 1,5 mm de diámetro. Los puntos con la misma especificidad de anticuerpo se alinearon entre ellos y se espaciaron separados unos de otros aproximadamente unos 200  $\mu\text{m}$ . Los anticuerpos utilizados se habían purificado y diluido en tampón PBS (pH 7,4) a una concentración que variaba desde 10 a 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los anticuerpos diluidos se unieron a la superficie del sustrato mediante absorción pasiva. Después de depositar el anticuerpo en la

superficie, el sustrato se saturó con PBS suplementado con un 1 % de BSA para evitar la unión no específica de los componentes de la muestra. Los portaobjetos se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Las condiciones que se utilizaron para obtener un confinamiento adecuado fueron las siguientes: canal 1: aspirado, canal 2: distribución, y canal 3: aspirado. Las suspensiones de glóbulos rojos sanguíneos que tenían diferentes fenotipos A y D (A+, A-, O+ y O-) se utilizaron como muestras.

### Procedimiento

Para demostrar la fiabilidad y verificar la especificidad de la determinación del grupo/fenotipado utilizando la tecnología de sonda microfluídica cada punto se ensayó uno tras otro con la misma solución de glóbulos rojos sanguíneos. En este ejemplo, los glóbulos rojos sanguíneos se lavaron primero en solución salina isotónica al 0,9 % y se suspendieron al 50 % en agua fisiológica. Se aspiraron 1,5 µl de la suspensión de glóbulos rojos sanguíneos a 1,5 µl/min. Para humedecer el portaobjetos, se distribuyó suficiente tampón PBS (líquido de procesamiento) en el portaobjetos para cubrir la superficie completa. La sonda de microfluídica se posicionó sobre el portaobjetos y se estableció entonces el confinamiento de flujo hidrodinámico. Cuando se estabilizó el confinamiento de flujo hidrodinámico, se programó el movimiento de la sonda de microfluídica siguiendo el eje X o eje Y a 0,02 mm/s de manera que se dibujara una línea recta pasando a lo largo de los puntos alineados. Durante el movimiento de la sonda, los glóbulos rojos sanguíneos distribuidos se ponían en contacto con la superficie saturada del sustrato o se ponían en contacto con uno de los anticuerpos aplicados puntualmente. Los glóbulos rojos sanguíneos que tenían la especificidad antigénica correcta se unían inmediatamente a los anticuerpos inmovilizados. Debido al depósito y aspiración continuos de las células y tampón de fluido de procesamiento, los glóbulos rojos sanguíneos no unidos se retiraban de manera concurrente con la unión de los glóbulos rojos sanguíneos. Después del depósito/aspiración de los glóbulos rojos sanguíneos, la presencia o ausencia de glóbulos rojos sanguíneos unidos al anticuerpo aplicado de manera puntual se detectó mediante captura de imágenes con una cámara. Conociendo la posición de cada anticuerpo específico sobre el sustrato, era posible identificar qué antígenos estaban presentes en la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos que se estaban ensayando, y por lo tanto identificar la especificidad del grupo sanguíneo de los glóbulos rojos sanguíneos que se estaban ensayando.

Se utilizaron como muestras glóbulos rojos sanguíneos A positivos (A+, A-) y glóbulos rojos sanguíneos D positivos (A+, O+), así como glóbulos rojos sanguíneos A- (O- y O+) y D negativos (O- y A-) y se depositaron en una línea con 2 puntos de cada uno. Los glóbulos rojos sanguíneos A positivos se unían fuertemente a la región explorada de la superficie del punto en el que se había inmovilizado el mAb anti-A (FIG. 14A), mientras que los glóbulos rojos sanguíneos A negativos no se unían para nada (FIG. 14B). Los glóbulos rojos sanguíneos D positivos también se unían fuertemente a la región explorada de la superficie del punto en el que se había inmovilizado el mAb anti-D (FIG. 14C), mientras que los glóbulos rojos sanguíneos D negativos no se unían para nada (FIG. 14D). Estos resultados demuestran que la unión que se observa era específica: la unión con el glóbulo rojo sanguíneo solo se produce cuando está implicado un par antígeno-anticuerpo. Estos resultados también demuestran la fiabilidad de la determinación del grupo/fenotipado multiplexado de dos parámetros de los glóbulos rojos sanguíneos utilizando la tecnología de sonda de microfluídica de la invención. De manera adicional, estos resultados muestran que la sonda de microfluídica puede utilizarse en un procedimiento de tipado de antígeno multiplex en el que se utiliza una sonda de microfluídica para aplicar los RBC a anticuerpos anti-glóbulos rojos sanguíneos sobre un sustrato sólido mientras que se retiran de manera concurrente los RBC no unidos. Estos resultados también muestran que se puede utilizar la misma muestra para llevar a cabo la reacción de multiplexado, es decir, la misma muestra se puede aplicar en todos los puntos.

### Ejemplo 6: Fenotipado de glóbulos rojos sanguíneos positivos a la prueba de Coombs directa: Ensayo de antiglobulina directo

El objetivo de este análisis es identificar mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos, las IgG humanas y/o fracción de complemento C3d adsorbidos sobre glóbulos rojos sanguíneos sensibilizados *in vivo*.

Aquí, para demostrar la posibilidad de detección de glóbulos rojos sanguíneos sensibilizados con la tecnología de la invención, se inmovilizó un mAb antiglobulina humana (un mAb IgG murino) sobre la superficie del sustrato. Se utilizó la sonda de microfluídica para distribuir los glóbulos rojos sanguíneos sensibilizados con IgG humana y para retirar los glóbulos rojos sanguíneos no unidos. El color rojo de los glóbulos rojos sanguíneos unidos al anticuerpo específico se detectó entonces visualmente mediante captura de imágenes con una cámara.

### Materiales

En este ejemplo, el agente de unión era un anticuerpo antiglobulina humana (un mAb IgG murino). Toda la superficie de un portaobjetos de poliestireno se funcionalizó manualmente con el anticuerpo. El anticuerpo purificado se diluyó en tampón PBS (pH 7,4) a una concentración que variaba de 10 a 500 µg/ml y se unió a la superficie del portaobjetos de poliestireno por absorción pasiva. Después de depositar el anticuerpo en la superficie del portaobjetos, el portaobjetos se saturó poniéndolo en contacto con PBS suplementado con un 1 % de BSA para evitar la unión no específica de los componentes de la muestra. Los portaobjetos se secaron y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Las condiciones que se utilizaron para obtener un confinamiento adecuado fueron las siguientes: canal 1: aspirado, canal 2: distribución, y canal 3: aspirado. Las suspensiones de glóbulos rojos sanguíneos sensibilizados, así como las suspensiones de glóbulos rojos sanguíneos nativos se utilizaron como muestras.

## Procedimiento

Para imitar los glóbulos rojos sanguíneos sensibilizados *in vivo*, se utilizó IgG anti-D humana para sensibilizar glóbulos rojos sanguíneos. Los glóbulos rojos sanguíneos D positivos que se habían lavado con solución salina isotónica al 0,9 % se suspendieron al 2 % en agua fisiológica. En paralelo, se preparó una solución de mAb anti-D humano a 20 µg/ml. La solución de RBC D positiva lavada se mezcló con la solución de mAb anti-D humano y se incubó durante 45 min a 37 °C. Para retirar el anticuerpo no unido, los RBC anti-D sensibilizados se lavaron con solución salina isotónica al 0,9 % y se suspendieron al 10 %. Los RBC anti-D sensibilizados se ensayaron en tarjetas de Coombs directas (IgG + C3d) y se obtuvo una fuerte reacción positiva. Se aspiraron entonces 2 µl de la suspensión de RBC sensibilizados a 1,8 µl/min con el canal 2 de la sonda de microfluídica. La superficie completa del portaobjetos se humedeció con PBS. La sonda se posicionó entonces por encima del portaobjetos. Tras la estabilización del confinamiento del flujo de la sonda de microfluídica, la sonda de microfluídica se programó para seguir una línea directa a lo largo del eje X a una velocidad de 0,02 mm/s.

Los glóbulos rojos sanguíneos sensibilizados con anti-D y los mismos glóbulos rojos sanguíneos sin sensibilización (es decir, los RBC nativos) se depositaron con la sonda de microfluídica sobre el portaobjetos que tiene un agente de unión del anticuerpo antiglobulina humana. Al mismo tiempo con la aplicación de la muestra con el agente de unión, se retiró el material no unido mediante la sonda. La presencia o ausencia de los glóbulos rojos sanguíneos unidos al anticuerpo se detectó mediante captura de imágenes con una cámara. Los RBC sensibilizados con anti-D se deberían unir al anticuerpo antiglobulina humana, mientras que los RBC que no se someten a sensibilización no se deberían unir al anticuerpo antiglobulina humana.

Los resultados muestran que solo los glóbulos rojos sanguíneos sensibilizados con anti-D se unen fuertemente al mAb antiglobulina humana a lo largo de toda la región de exploración (FIG. 15), mientras que los glóbulos rojos sanguíneos nativos no se unían para nada (no mostrado). Estos resultados demuestran que la unión observada es específica. De manera adicional, estos resultados muestran que la sonda de microfluídica puede utilizarse en un ensayo de antiglobulina directo en el que se utiliza una sonda de microfluídica para aplicar glóbulos rojos sanguíneos sensibilizados con IgG humana en los anticuerpos monoclonales antiglobulina humana sobre un sustrato sólido mientras que se retiran de manera concurrente los RBC no unidos.

## Ejemplo 7A: Exploración/identificación de anticuerpos

La exploración de anticuerpos anti-glóbulos rojos sanguíneos es necesaria para permitir una transfusión compatible entre un donante y un receptor. El fin es verificar que el plasma del receptor no contiene anticuerpos dirigidos contra los glóbulos rojos sanguíneos del donante que se deben transfundir. La exploración necesita el uso de varios glóbulos rojos sanguíneos caracterizados por la distribución de antígenos de grupos sanguíneos en su superficie. Dicha exploración es como sigue: los glóbulos rojos sanguíneos cuyo fenotipo es conocido se incuban con la muestra de suero o plasma que se va a ensayar. Si están presentes, los anticuerpos específicos se unen a la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos y se detectan con un reactivo que contienen un anticuerpo antiglobulina humana. Utilizando los paneles de glóbulos rojos sanguíneos que tienen o no tienen distintos antígenos, es posible entonces determinar la especificidad de los anticuerpos presentes en la muestra. Para demostrar la posibilidad de la exploración e identificación de anticuerpos con la tecnología de la invención, se utilizó la superficie del sustrato para Inmovilizar glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados mediante un anticuerpo universal. La sonda de microfluídica se utilizó entonces para distribuir el anticuerpo monoclonal anti-D para imitar el plasma del paciente. Mientras que distribuye el anticuerpo monoclonal anti-D, la sonda retira de manera concurrente el material no unido específicamente. La sonda también se utilizó para distribuir 10 µg/ml de anticuerpo antiglobulina human marcado con ficoeritrina (anticuerpo secundario) para detectar el anticuerpo monoclonal anti-D unido.

## Materiales

En este ejemplo, toda la superficie de los cubreobjetos de poliestireno se funcionalizó manualmente con un anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos universal. El anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos se purificó y se diluyó en tampón PBS (pH 7,4) a concentraciones de 100 µg/ml y se unió a la superficie de los portaobjetos por absorción pasiva. Los portaobjetos se saturaron poniéndolos en contacto con PBS suplementado con un 1 % de BSA para evitar la unión no específica de los componentes de la muestra. Después de secarlos al aire, los portaobjetos se almacenaban a 4 °C hasta su uso. Los glóbulos rojos sanguíneos fenotipados se lavaron con una solución salina isotónica al 0,9 %, y luego se suspendieron al 0,5 %. La suspensión de glóbulos rojos sanguíneos se incubó entonces con un portaobjetos durante 20 min a 37 °C en una sala húmeda. Luego, se lavó el portaobjeto con una solución salina isotónica al 0,9 % para retirar los glóbulos rojos sanguíneos no unidos. Se utilizó entonces una sonda de microfluídica para depositar una mezcla de muestra de 4 µg/ml de mAb anti-D monoclonal (anticuerpo primario) y 10 µg/ml de mAb antiglobulina humana marcado con ficoeritrina (anticuerpo secundario) diluido en un tampón de baja fuerza iónica. Debido a que la mezcla de muestra no era detectable sin un marcado, la sonda de microfluídica se ejecutó en modo de doble confinamiento de flujo que significa que la mezcla de muestra se anudó dentro de otra con forma de líquido que por sí misma se confinaba dentro del líquido de inmersión (PBS). En este caso, el segundo confinamiento se llevó a cabo con una solución de fluoresceína, que era visible y garantizaba el confinamiento apropiado de la mezcla de muestra. Con la sonda de microfluídica, la mezcla de muestra se distribuyó con el canal 2 y se aspiró con el canal 3, y la solución de fluoresceína se distribuyó con el canal 1 y se aspiró con el canal 4.

**Procedimiento**

La mezcla (3  $\mu$ l) del mAb monoclonal anti-D con 10  $\mu$ g/ml de mAb antiglobulina humana marcado con ficoeritrina se aspiró a 3,5  $\mu$ l/min con el canal 2 de la sonda de microfluídica. Una cantidad de tampón PBS adecuada (líquido de procesamiento) se distribuyó en toda la superficie húmeda del portaobjetos. La sonda de microfluídica se posicionó entonces sobre el portaobjetos y se estableció entonces el modo de confinamiento doble de flujo hidrodinámico. Después de la estabilización del confinamiento doble de flujo, la sonda se configuró para mantenerse entre 30 s a 180 s en la misma localización. La aplicación de la muestra y la retirada del material no unido era de manera concurrente. La presencia o ausencia del anticuerpo marcado por el mAb antiglobulina humana y unido a los glóbulos rojos sanguíneos nativos se detectó leyendo la fluorescencia con un analizador de micromatriz de fluorescencia SensoSpot (Sensovation AG, Radolfzell, GE).

Como se muestra en la FIG. 16, el mAb anti-D se unía a los RBC D positivos, sin importar cuanto se mantiene la sonda en la misma localización. Se obtuvieron resultados similares cuando el mAb monoclonal anti-D y el mAb antiglobulina humana marcado se aplicaban por separado en los RBC D positivos. Este experimento demuestra que la sonda de microfluídica se puede utilizar en un procedimiento de exploración/identificación de anticuerpos en el que la muestra se aplica de manera concurrente con la retirada del material no unido.

**Ejemplo 7B: Ensayo de grupos ABO inverso**

El objetivo de este análisis era demostrar la presencia o ausencia, en una muestra de sangre, de anticuerpos naturales dirigidos contra los antígenos del grupo sanguíneo A y/o B. El resultado de este análisis, combinado con el que se obtiene en un ensayo directo, hará posible establecer el grupo ABO de la muestra. La muestra que se utiliza en el ensayo de grupo ABO inverso puede ser una muestra de suero, plasma o sangre completa. Para demostrar la posibilidad de agrupamiento ABO inverso con la tecnología de la invención, se utilizó la superficie del sustrato para Inmovilizar glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos mediante un anticuerpo universal. Para esta aplicación, la sonda de microfluídica se utilizó para depositar el plasma, suero del paciente y para retirar el material no unido.

**Materiales**

Como en el ejemplo previo, la superficie de todo el cubreobjetos de poliestireno se funcionalizó completamente con un anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos universal. Después de depositar el anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos universal en la superficie de los portaobjetos, los portaobjetos se saturaron poniéndolos en contacto con PBS suplementado con un 1 % de BSA para evitar la unión no específica de los componentes de la muestra. Estos portaobjetos se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Los glóbulos rojos sanguíneos fenotipados A positivos se lavaron con una solución salina isotónica al 0,9 % y se suspendieron a una concentración final del 0,5 %. Esta suspensión de glóbulos rojos sanguíneos se incubó entonces con un portaobjetos durante 20 min a 37 °C en una sala húmeda. Luego, se lavó el portaobjeto con una solución salina isotónica al 0,9 % para retirar los glóbulos rojos sanguíneos no unidos. La sonda de microfluídica se utilizó entonces para depositar plasma de una persona de tipo sanguíneo B. Debido a que no era detectable el plasma sin algún marcador, la sonda de microfluídica se utilizó de nuevo en modo de confinamiento doble como en el ejemplo previo.

**Procedimiento**

La muestra de plasma se aspiró a 3,2  $\mu$ l/min con el canal 2 de la sonda de microfluídica. Se distribuyó un tampón adecuado (líquido de procesamiento) en el portaobjetos para humedecer la superficie completa. La sonda de microfluídica se posicionó sobre el portaobjetos y se estableció entonces el modo de confinamiento doble de flujo. Cuando el confinamiento doble de flujo estaba estabilizado, la sonda se configuró para mantenerse entre 30 s a 180 s en la misma localización. De nuevo, la aplicación de la muestra y la retirada de material no unido se producía de manera simultánea. El portaobjetos se incubó entonces durante 15 min a 37 °C en un baño con 10  $\mu$ g/ml de Ab anti-H+L humana marcado con ficoeritrina. La presencia o ausencia del anticuerpo marcado por el Ab anti-H+L humana y unido a los glóbulos rojos sanguíneos nativos se detectó leyendo la fluorescencia con un analizador de micromatriz de fluorescencia SensoSpot (Sensovation AG, Radolfzell, GE).

Como se muestra en la FIG. 17, el mAb anti-D se unía a los RBC A positivos, la intensidad de la unión aumenta con el tiempo en que la sonda se mantiene en la misma localización. Este experimento demostraba que se puede utilizar una sonda de microfluídica en un procedimiento de agrupamiento inverso en el que el plasma del paciente se aplica en los glóbulos rojos sanguíneos fenotipados de manera concurrente con la retirada de material de plasma no unido.

**Ejemplo 8: Compatibilidad cruzada**

Un objetivo de este análisis era estar seguros de que en el contexto de una transfusión de uno o más concentrados de células sanguíneas de donantes a un receptor, había una compatibilidad donante-receptor completa. Otro objetivo era demostrar una incompatibilidad unida a la presencia de anticuerpos en el plasma del receptor, dirigido contra las estructuras de grupos sanguíneo que llevan los glóbulos rojos sanguíneos del donante. Se utilizó la sonda de microfluídica para llevar a cabo la inmovilización de los glóbulos rojos sanguíneos del donante mediante un anticuerpo universal, para depositar el plasma del paciente, y para retirar el material del plasma del paciente unido no específicamente. La detección de la presencia o ausencia de los anticuerpos del plasma unidos a los glóbulos rojos

sanguíneos se llevó a cabo con un Ab antiglobulina humana marcado.

### **Materiales**

La superficie de todo el cubreobjetos de poliestireno se funcionalizó completamente con un anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos universal como en el Ejemplo 7A. Después de depositar el anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos universal en la superficie de los portaobjetos, los portaobjetos se saturaron poniéndolos en contacto con PBS suplementado con un 1 % de BSA para evitar la unión no específica de los componentes de la muestra. Los portaobjetos se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Los glóbulos rojos sanguíneos A+ del donante se lavaron con una solución salina isotónica al 0,9 % y se suspendieron a una concentración del 50 %. Para distribuir los RBC A+ del donante, se operó la sonda de microfluídica en modo de confinamiento de flujo hidrodinámico de la siguiente manera: canal 1: aspirado, canal 2: distribución, y canal 3: aspirado. Luego se utilizó un modo de confinamiento doble para distribuir el plasma del paciente A+ u O+ de la siguiente manera: se distribuyó el plasma con el canal 2 y se aspiró con el canal 3 y se distribuyó la solución de fluoresceína con el canal 1 y se aspiró con el canal 4.

### **Procedimiento**

En este ejemplo, se aspiraron 2,5 µl de la suspensión de glóbulos rojos sanguíneos A+ del donante (de la suspensión diluida al 50 %) a 1,5 µl/min con la sonda de microfluídica. Se distribuyó un tampón PBS (líquido de procesamiento) en el portaobjetos para humedecer la superficie completa. La sonda de microfluídica se posicionó entonces sobre el portaobjetos y se estableció entonces el confinamiento de flujo. Cuando se estabilizó el confinamiento de flujo, se programó el movimiento de la sonda de microfluídica a 0,03 mm/s para trazar una línea recta a lo largo del eje X. La longitud de la línea era de aproximadamente 12 mm. Durante el movimiento de la sonda, los glóbulos rojos sanguíneos A+ del donante se unían inmediatamente al anticuerpo anti-glóbulos rojos sanguíneos universal unido a la superficie del portaobjetos. Debido al flujo continuo, como los glóbulos rojos sanguíneos se distribuyeron, los glóbulos rojos sanguíneos no unidos se retiraron de manera concurrente. La sonda de microfluídica se utilizó entonces para depositar el plasma A+ u O+ del paciente en modo de confinamiento de flujo dual como se ha descrito previamente. Con la sonda de microfluídica, se aspiraron 2 µl del plasma a 3 µl/min. La sonda de microfluídica se configuró para permanecer en la misma localización durante 60 segundos con el plasma A+ y durante 30 o 60 s con el plasma O+. De manera concurrente con la aplicación del plasma a los RBC aplicados previamente, se retiró el material no unido con la sonda. El portaobjetos se incubó entonces durante 15 min a 37 °C en un baño con 10 µg/ml de Ab antiglobulina humana marcado con ficoeritrina. Finalmente, la presencia o ausencia del anticuerpo marcado por el Ab antiglobulina humana marcado con ficoeritrina y unido a los glóbulos rojos sanguíneos nativos se detectó leyendo la fluorescencia con un analizador de micromatriz de fluorescencia SensoSpot (Sensovation AG, Radolfzell, GE).

Como se muestra en las FIG. 18A y 18B, el plasma A+ no se unía a los glóbulos rojos sanguíneos A+ (por ejemplo, solo se detectaba un punto débil). Sin embargo, se observó la unión con el plasma O+, incluso con un tiempo de incubación de 30 s. Este experimento demostraba que se puede utilizar la sonda de microfluídica en un procedimiento de compatibilidad cruzada en el que el plasma del donante se aplica a los glóbulos rojos sanguíneos de manera concurrente con la retirada del material del plasma no unido.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de una sustancia en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
  - 5 aplicar la muestra en una superficie de un sustrato que tiene un agente de unión inmovilizado sobre este, en el que el agente de unión es capaz de unirse a la sustancia de la muestra;
  - retirar el material no unido de al menos una parte del sustrato que tiene inmovilizado el agente de unión; y
  - la respuesta al detectar la sustancia unida al agente de unión inmovilizado en el sustrato, que identifica la sustancia presente en la muestra;
  - 10 y la respuesta al no detectar la sustancia unida al agente de unión inmovilizado en el sustrato, que determina que la sustancia está ausente en la muestra;
  - caracterizado porque**
  - la etapa de aplicación de la muestra en la superficie de sustrato es concurrente con la etapa de la retirada del material no unido de al menos una parte de sustrato, y las etapas de la aplicación de la muestra en la superficie del sustrato y la retirada del material no unido de al menos una parte de sustrato se llevan a cabo con un distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico, en el que el distribuidor es una sonda de microfluídica que tiene una pluralidad de microcanales.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el distribuidor es una matriz de sondas de microfluídica.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el distribuidor es una sonda de microfluídica que tiene un microcanal que excluye los glóbulos rojos sanguíneos basándose en el tamaño, preferentemente, el microcanal incluye una sección transversal que tiene un diámetro de
  - (i) menos de 6  $\mu\text{m}$ ; o
  - (ii) menos de 4  $\mu\text{m}$ ; o
  - (ii) menos de 2  $\mu\text{m}$ ; o
  - (iv) 1 a 2  $\mu\text{m}$ .
- 25 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que
  - (i) la superficie del sustrato está húmeda; y/o
  - (ii) la etapa de aplicación de una muestra en la superficie de sustrato comprende la distribución de una o más muestras cada una en al menos una vía diferente, preferentemente, la vía es una línea recta; y/o
  - (iii) la vía tiene una anchura de 25 nm a 500  $\mu\text{m}$ ; y/o
  - 30 (iv) la etapa de aplicación de una muestra en la superficie de sustrato comprende la distribución de una o más muestras cada una en al menos un punto diferente.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que
  - (i) la muestra comprende una muestra de sangre; o
  - 35 (ii) la muestra comprende un componente seleccionado de entre sangre completa, glóbulos rojos sanguíneos, plasma, suero, y saliva.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente de unión
  - (i) comprende uno o más anticuerpos contra los antígenos unidos a la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos; y/o
  - 40 (ii) comprende uno o más glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados; y/o
  - (iii) comprende uno o más antígenos recombinantes; y/o
  - (iv) comprende uno o más anticuerpos contra los antígenos de los glóbulos rojos sanguíneos y uno o más glóbulos rojos sanguíneos fenotipados nativos o hemolizados; y/o
  - (v) se inmoviliza en una línea separada; y/o
  - (vi) se inmoviliza en un punto separado; y/o
  - 45 (vii) son de 1 a 50 agentes de unión.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que
  - (i) la sustancia comprende uno o más anticuerpos contra los antígenos de glóbulos rojos sanguíneos; y/o
  - (ii) la sustancia comprende uno o más antígenos de glóbulos rojos sanguíneos; y/o
  - 50 (iii) el sustrato está formado por al menos un material seleccionado de entre tereftalato de polietileno, polipropileno, poliestireno, polímero de dextrano, dendrímero, oligonucleótido, policarbonato, plástico, vidrio, silicio, óxido de silicio, metales y óxidos metálicos, y metales y óxidos metálicos funcionalizados con polímeros, PVDF, nitrocelulosa, nailon y polisulfona.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, que es un procedimiento de compatibilidad cruzada que comprende:
  - la aplicación de los glóbulos rojos sanguíneos (RBC) del donante en una superficie de un sustrato que tiene

- inmovilizado un agente de unión sobre este, en el que el agente de unión es capaz de unirse a los RBC del donante; la retirada de los RBC del donante no unidos de al menos una parte del sustrato que tiene inmovilizado el agente de unión; en el que la etapa de aplicación de los RBC del donante en la superficie de sustrato es concurrente con la etapa de retirada de las RBC del donante no unidos de al menos una parte de sustrato;
- 5 el depósito del plasma del paciente sobre los RBC del donante; y  
la retirada de una parte no unida del plasma del paciente; en el que la etapa de depósito de plasma de un paciente es concurrente con la etapa de la retirada de la parte no unida de plasma del paciente;
- 10 la respuesta al detectar un anticuerpo unido a los RBC del donante, determina que el anticuerpo está presente en el plasma del paciente; y  
la respuesta al no detectar el anticuerpo unido a los RBC del donante, determina que el anticuerpo está ausente del plasma del paciente, en el que las etapas de la aplicación de los RBC del donante, la retirada de los RBC no unidos del donante, el depósito del plasma del paciente y la retirada de la parte no unida de plasma del paciente se llevan a cabo con un distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico, en el que el distribuidor es una sonda de microfluídica que tiene una pluralidad de microcanales.
- 15 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que los RBC del donante son RBC fenotipados nativos o hemolizados.
10. El procedimiento de la reivindicación 8 o 9, en el que el agente de unión comprende la unión de lectinas o anticuerpos universales anti-glóbulos rojos sanguíneos.
11. Un sistema para llevar a cabo el procedimiento de la reivindicación 1 que comprende:
- 20 un sustrato que tiene un agente de unión inmovilizado en localizaciones diferentes, en el que el agente de unión es capaz de unirse a una sustancia de una muestra; un distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico configurado para distribuir la muestra en el sustrato y retirar el material no unido del sustrato simultáneamente, siendo dicho distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico una sonda de microfluídica que tiene una pluralidad de microcanales;
- 25 una fuente lumínica configurada para iluminar el sustrato; y  
un detector configurado para detectar la presencia o ausencia de la sustancia unida al agente de unión.
12. El sistema de la reivindicación 11, en el que el distribuidor es una matriz de sondas de microfluídica.
13. El sistema de la reivindicación 11 o 12 previas, en el que el distribuidor es una sonda de microfluídica que tiene un microcanal que excluye los glóbulos rojos sanguíneos basándose en el tamaño, preferentemente, el microcanal incluye una sección transversal que tiene un diámetro de
- 30 (i) menos de 6  $\mu\text{m}$ ; o  
(ii) menos de 4  $\mu\text{m}$ ; o  
(ii) menos de 2  $\mu\text{m}$ ; o  
(iv) 1 a 2  $\mu\text{m}$ .
- 35 14. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el sustrato está formado por al menos un material seleccionado de entre tereftalato de polietileno, polipropileno, poliestireno, polímero de dextrano, dendrímero, oligonucleótido, policarbonato, plástico, vidrio, silicio, óxido de silicio, metales y óxidos metálicos, y metales y óxidos metálicos funcionalizados con polímeros, PVDF, nitrocelulosa, nailon y polisulfona.
15. El sistema de la reivindicación 11, que es un sistema para compatibilidad cruzada que comprende:
- 40 un sustrato que tiene inmovilizados los glóbulos rojos sanguíneos del donante en localizaciones diferentes sobre este; un distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico configurado para distribuir simultáneamente los glóbulos rojos sanguíneos RBC del donante o el plasma del paciente en el sustrato y retirar los RBC del donante no unidos o una parte del plasma del paciente no unida del sustrato, siendo dicho distribuidor de confinamiento de flujo hidrodinámico una sonda de microfluídica que tiene una pluralidad de microcanales;
- 45 una fuente lumínica configurada para iluminar el sustrato; y  
un detector configurado para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos unidos a los RBC del donante.

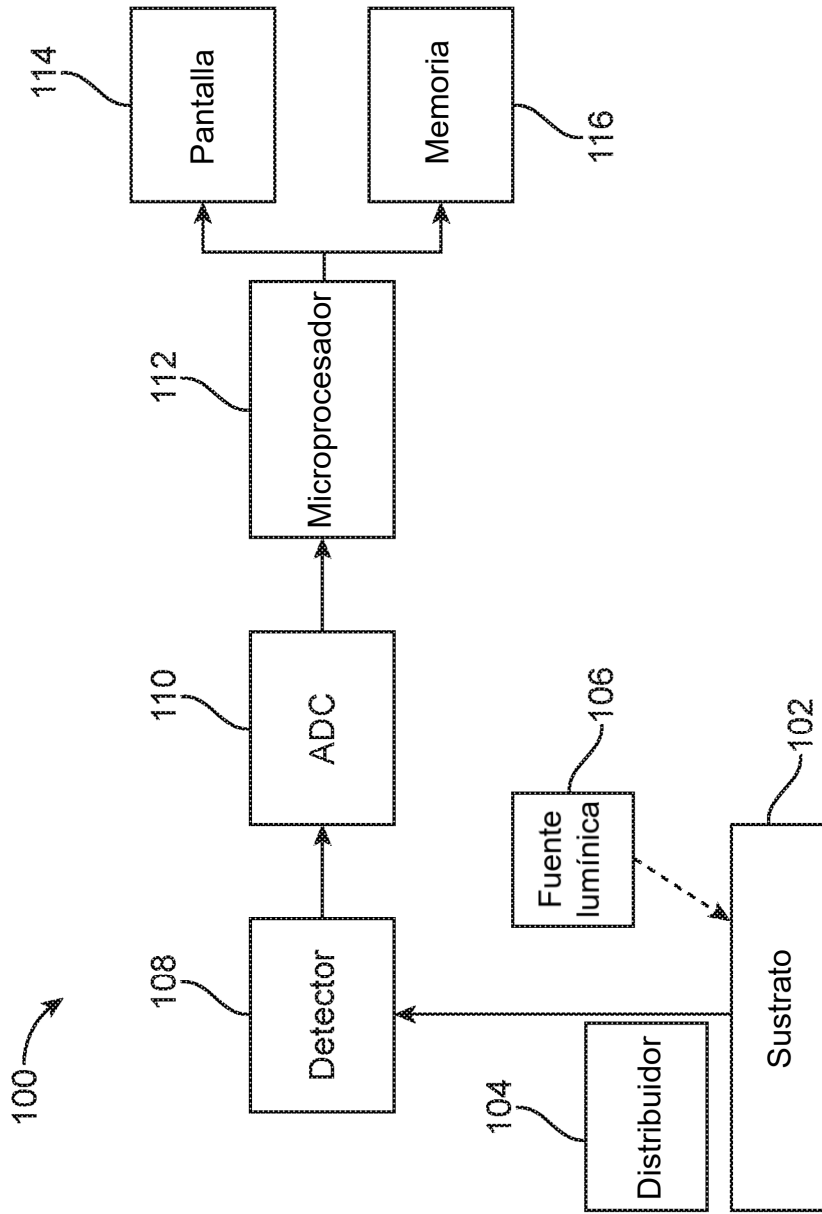


FIG. 1

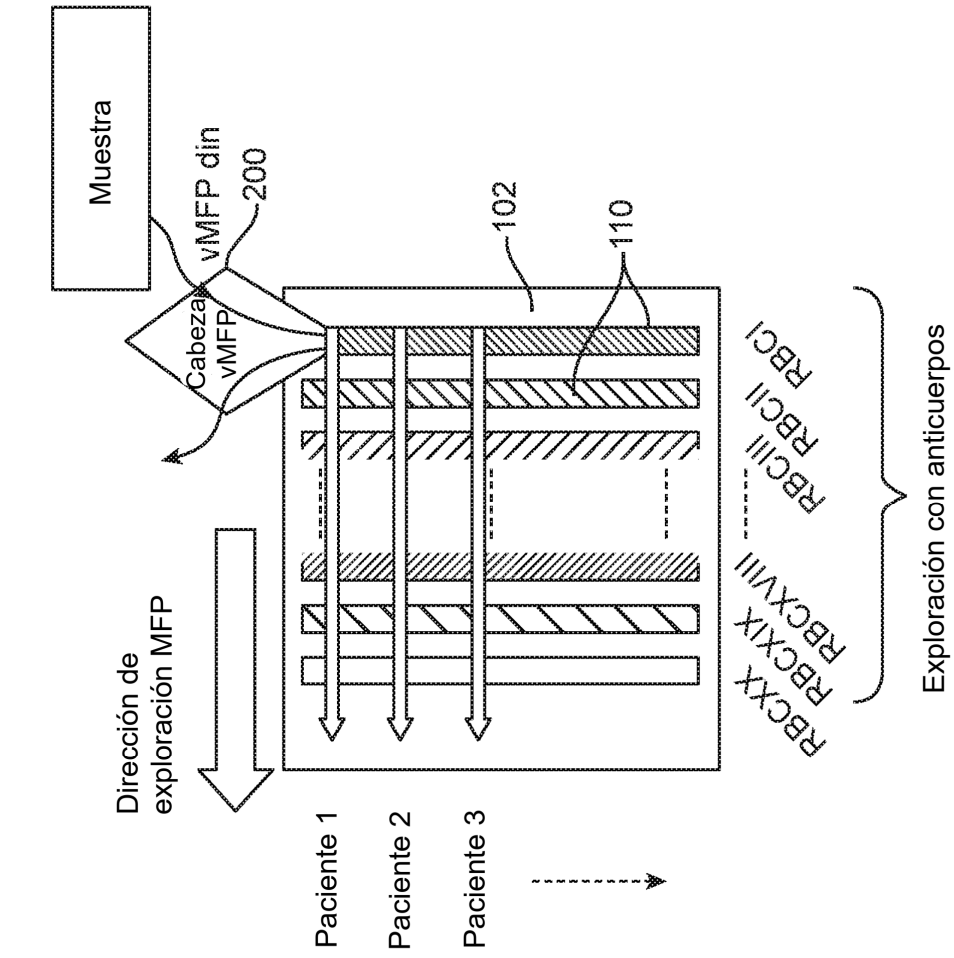


FIG. 3

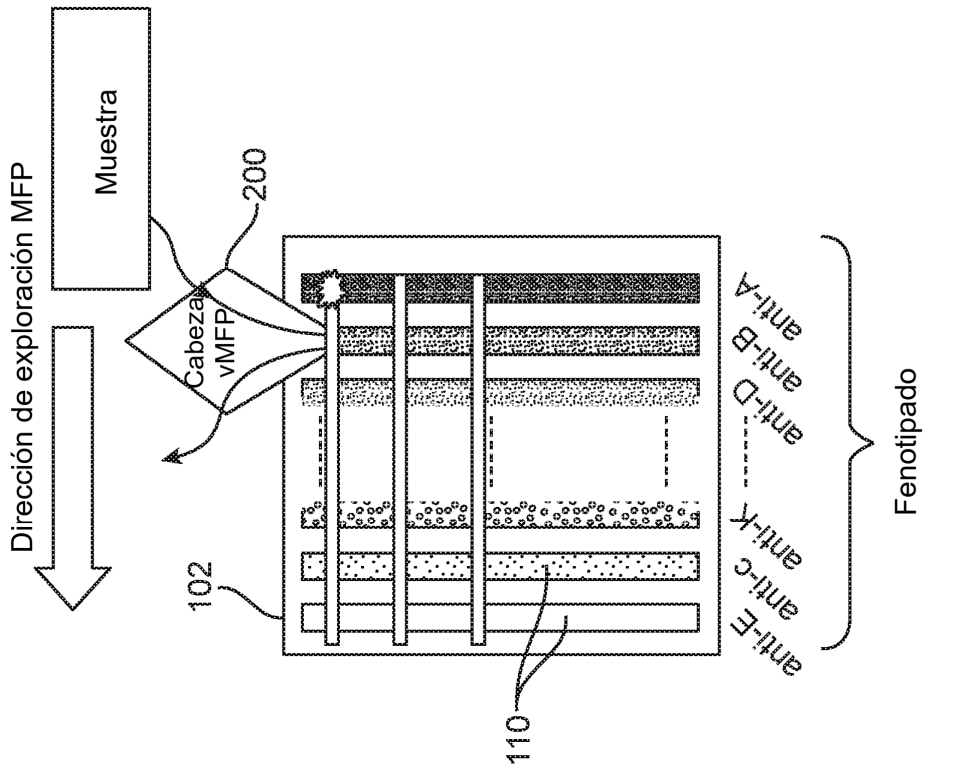


FIG. 2

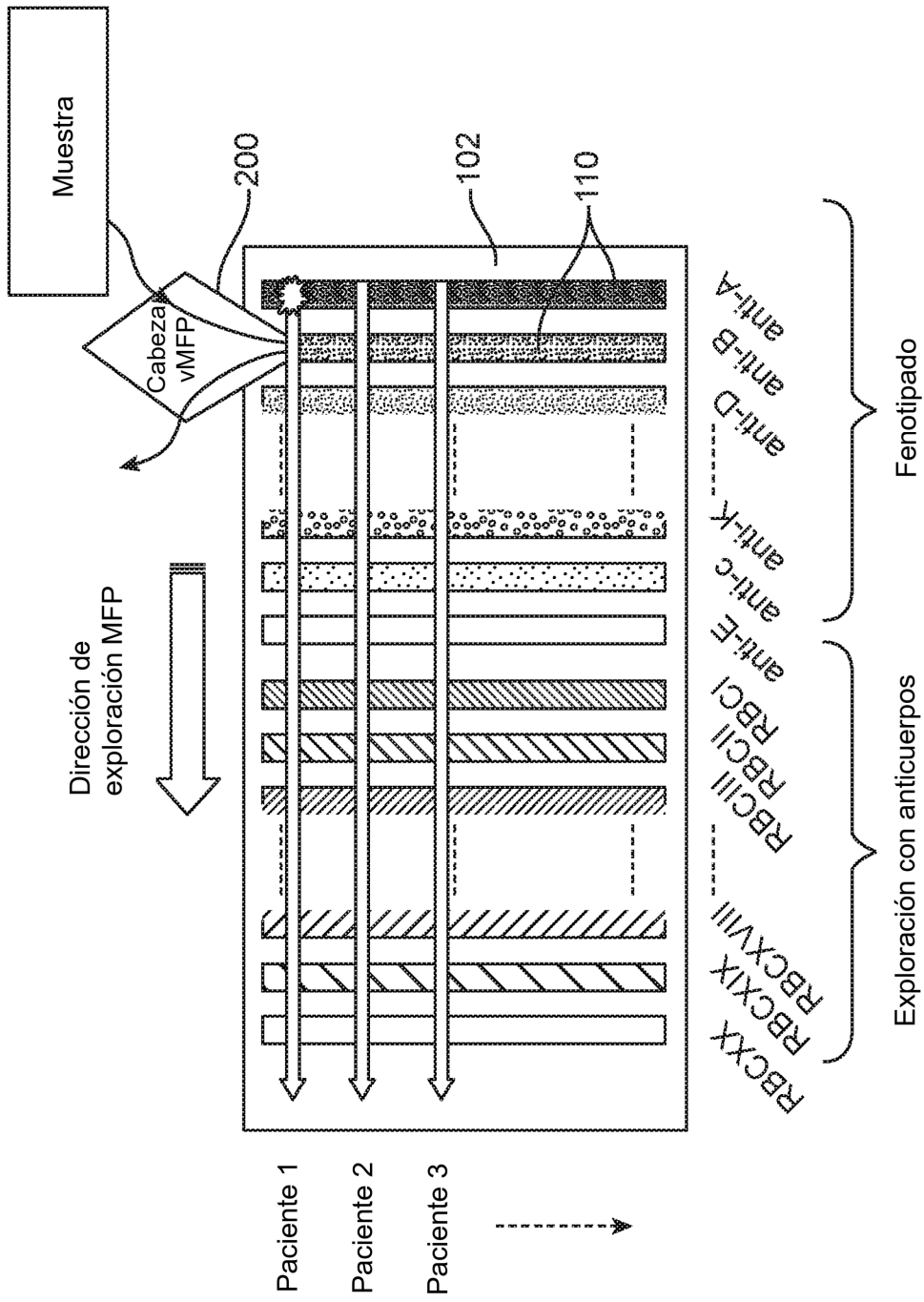


FIG. 4



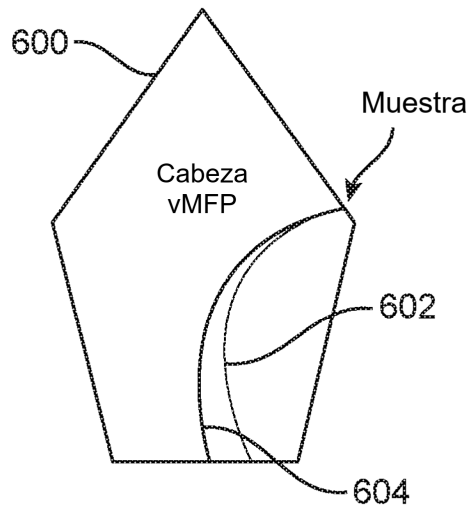


FIG. 6

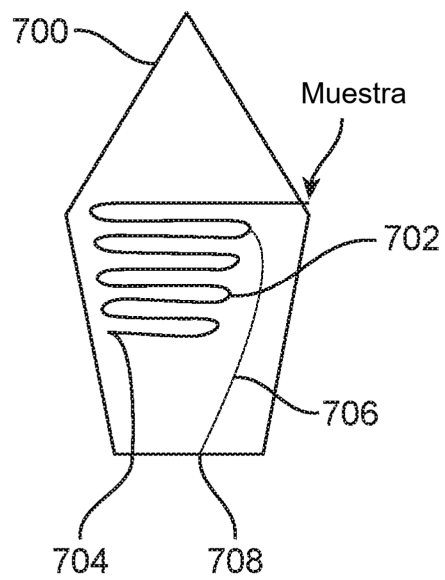


FIG. 7

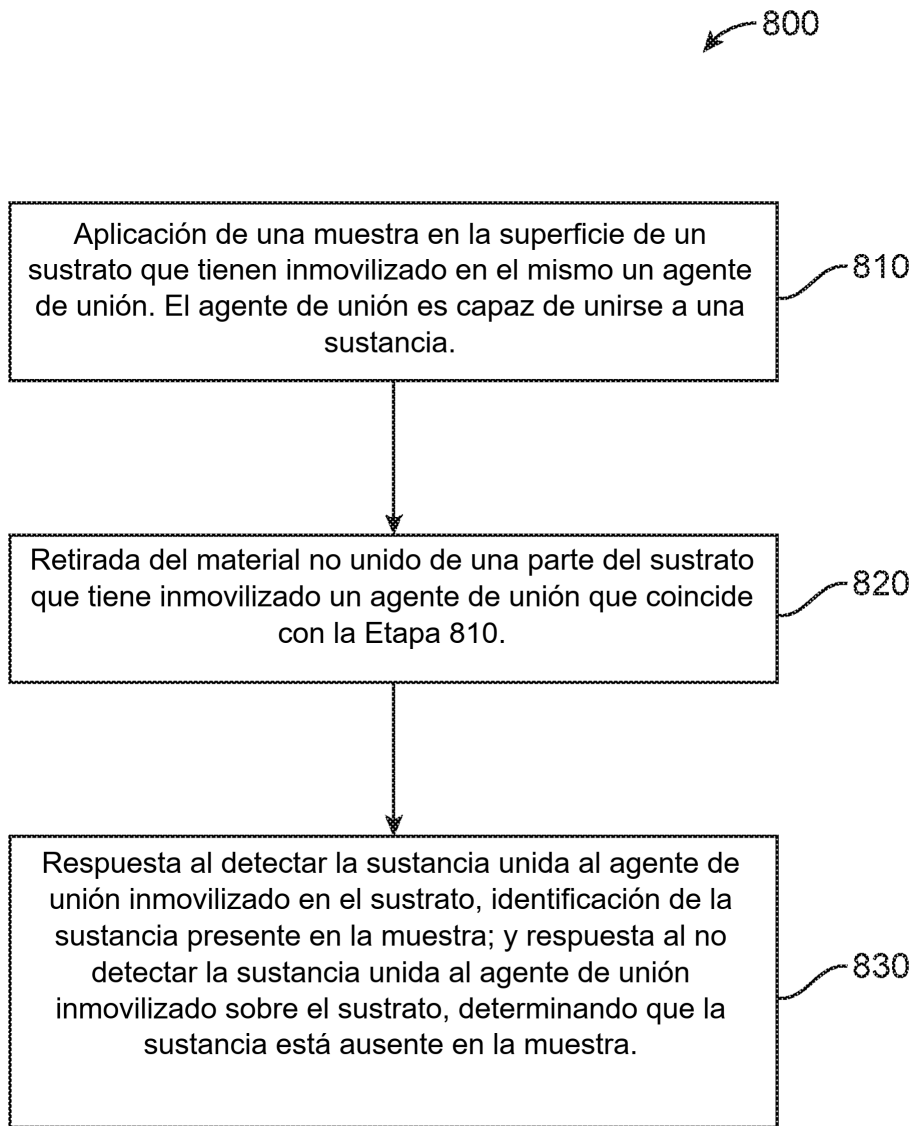


FIG. 8

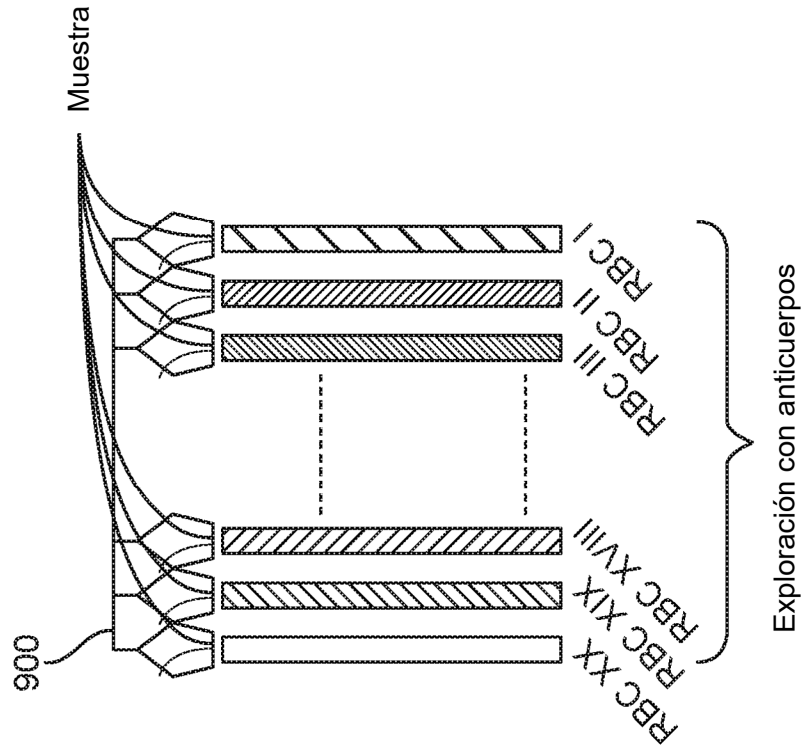


FIG. 10

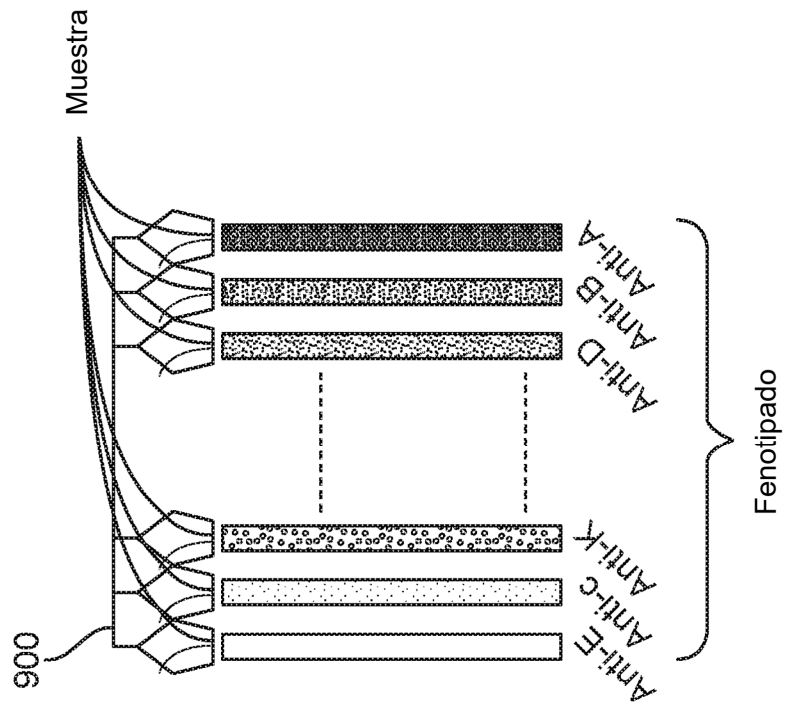


FIG. 9

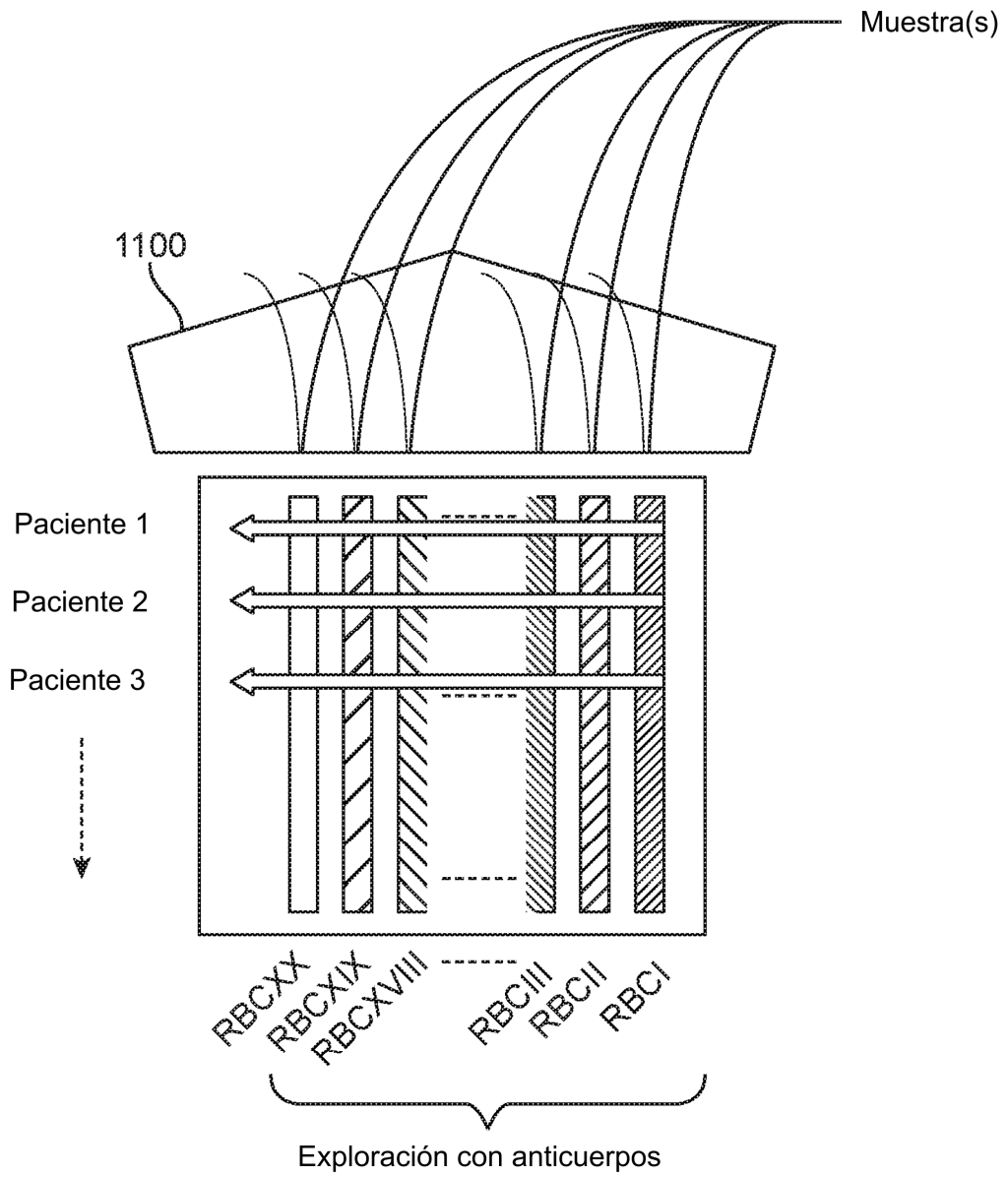


FIG. 11

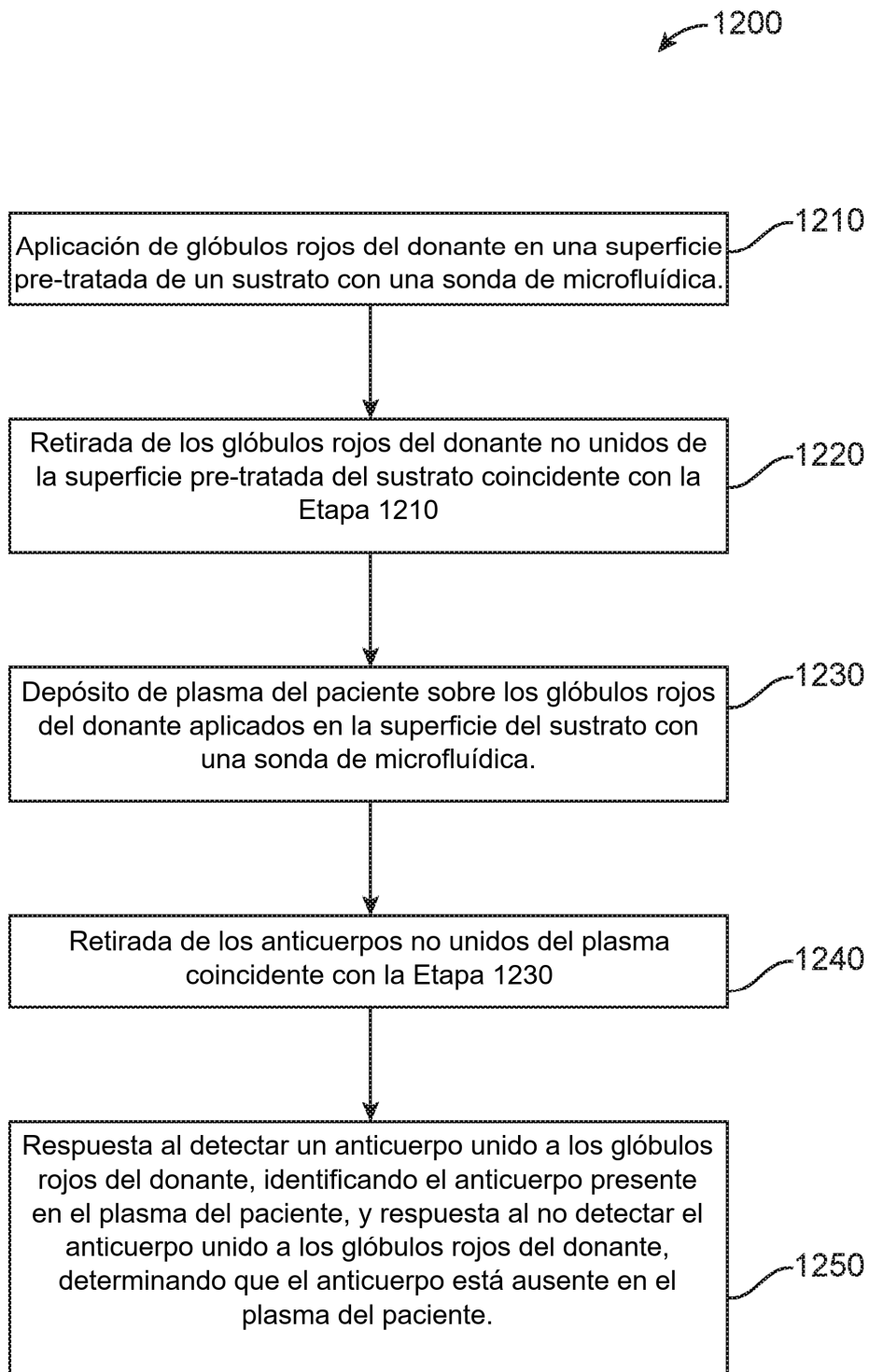


FIG. 12

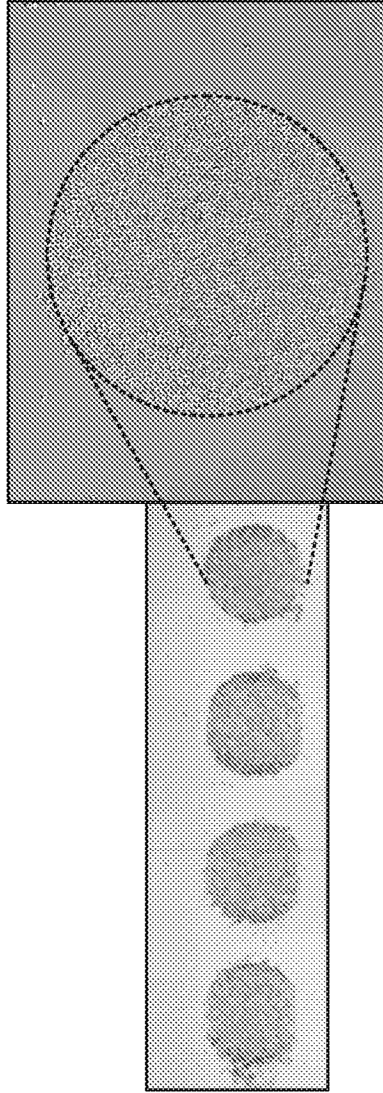


FIG. 13B

FIG. 13A

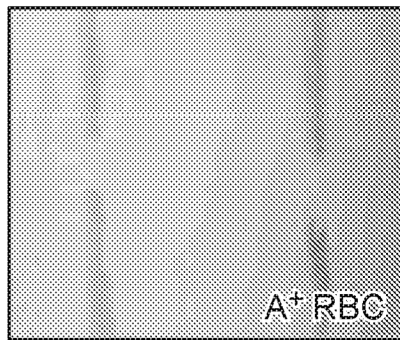
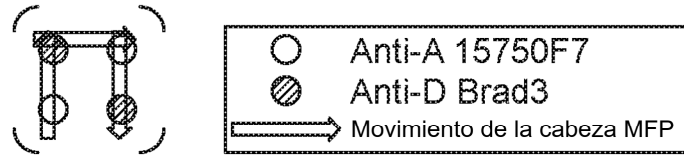


FIG. 14A



FIG. 14B

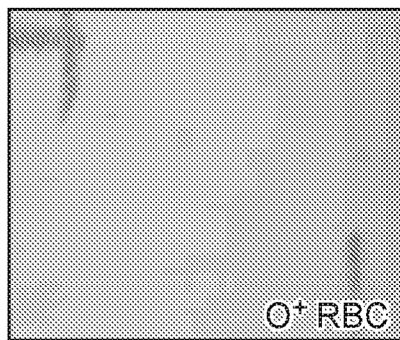


FIG. 14C

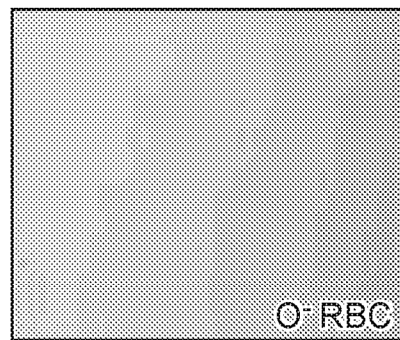


FIG. 14D

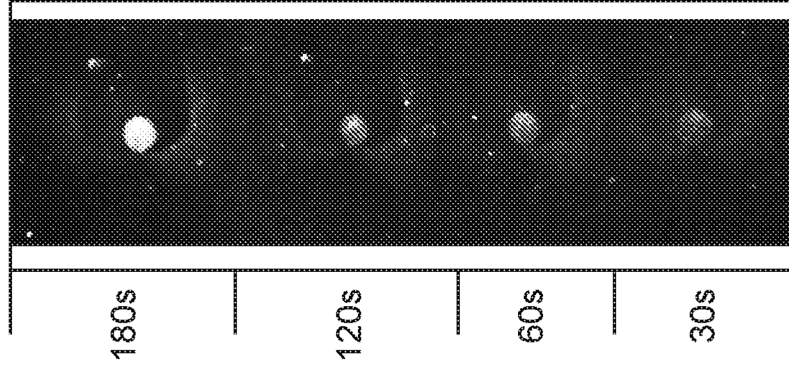


FIG. 17

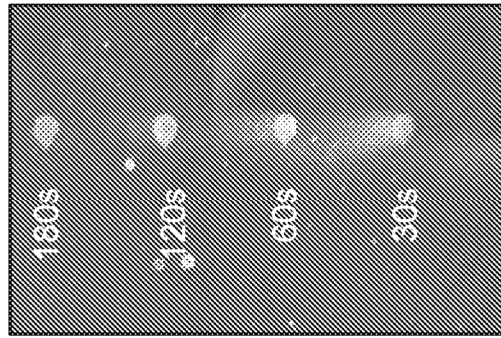


FIG. 16

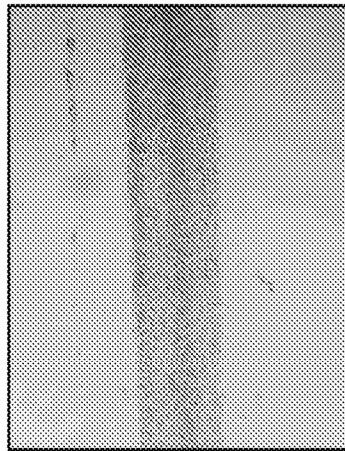
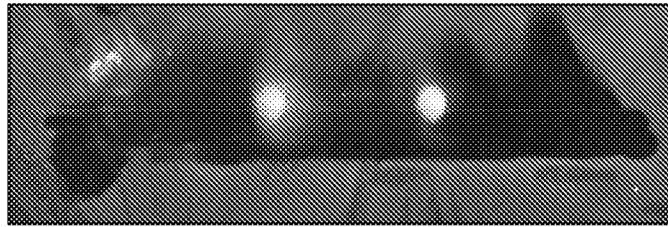


FIG. 15



Plasma A+   Plasma O+   Plasma O+  
60 segundos   30 segundos   60 segundos

FIG. 18A

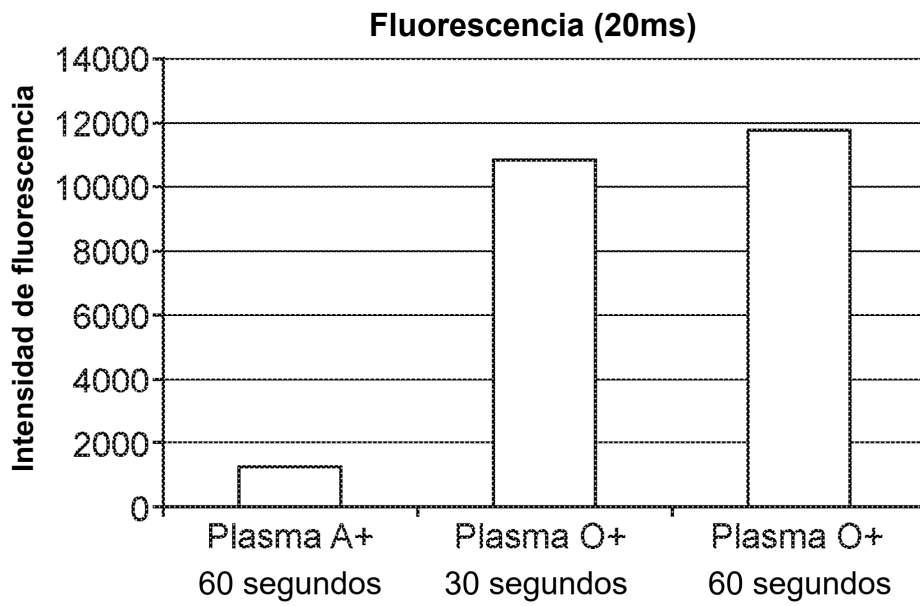


FIG. 18B