

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 456**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06701262 .5**

96 Fecha de presentación: **25.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1841885**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2007**

54 Título: **PAR DE SONDAS OLIGONUCLEOTÍDICAS PARA EL GENOTIPADO DEL SISTEMA ERITROCITARIO KIDD/JK, PROCEDIMIENTOS Y KITS DE DIAGNÓSTICO CORRESPONDIENTES.**

30 Prioridad:
25.01.2005 IT MI20050098

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2012

73 Titular/es:
**FONDAZIONE IRCCS "CA' GRANDA - OSPEDALE
MAGGIORE POLICLINICO"
VIA FRANCESCO SFORZA, 28
20122 MILAN, IT**

72 Inventor/es:
**POLI, Francesca;
DRAGO, Francesca;
VILLA, Maria Antonietta;
ESPADAS DE ARIAS, Alejandro y
CRESPIATICO, Loretta**

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

ES 2 373 456 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

Par de sondas oligonucleotídicas para el genotipado del sistema eritrocitario Kidd/Jk, procedimientos y kits de diagnóstico correspondientes.

5 La presente invención se refiere a pares de sondas oligonucleotídicas específicos para ser utilizados en procedimientos de genotipado de sistemas eritrocitarios y a los kits para diagnóstico correspondientes.

10 El tipado de sistemas antigénicos eritrocitarios se efectúa tradicionalmente con los procedimientos de aglutinación en fase líquida o en fase sólida utilizando antisueros policlonales o monoclonales comerciales. Esta técnica es sencilla, puede aplicarse en todos los laboratorios y presenta una sensibilidad y una especificidad apropiadas en uso clínico en la mayoría de los casos.

15 Las pruebas de aglutinación, sin embargo, presentan varias limitaciones principalmente relacionadas con la dificultad de evaluar el punto fuerte antigénico en algunas condiciones particularmente arriesgadas. Éstas son principalmente: a) el tipado de pacientes politransfundidos inmunizados; b) la identificación de un feto en situación de riesgo de enfermedad hemolítica del recién nacido debido a la presencia de anticuerpos maternos; c) la determinación de variantes débiles; d) la determinación de cigosidad para el antígeno RhD; e) la determinación de fenotipos nulos para antígenos de eritrocitos.

20 Por otra parte, la utilización de técnicas de aglutinación conlleva costes elevados en el caso de cribado en masa a fin de encontrar donantes negativos para antígenos de eritrocitos de gran incidencia. Para algunos de estos sistemas, la disponibilidad de reactivos de tipado comerciales es muy limitada o inexistente.

25 Una de las principales ventajas de las técnicas a base de ADN es independiente de los reactivos ya que los sueros para tipado se sustituyen por oligonucleótidos que pueden ser sintetizados químicamente a bajo coste.

Por esta razón, se han desarrollado varias técnicas basadas en el análisis de ADN para el tipado de sistemas eritrocitarios a escala molecular.

30 En particular, para el genotipado de sistemas antigénicos eritrocitarios, las técnicas más frecuentes utilizadas en inmunohematología son PCR-RFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) y RCP-SSP (Cebadores específicos de secuencias). Recientemente se han desarrollado nuevos procedimientos para el estudio de veintiocho de los veintinueve sistemas eritrocitarios cuya secuencia es conocida, tales como, por ejemplo, RCP-ELISA (para sistemas antigénicos RHD, RHCE, Kell, Duffy y Kidd), RCP en tiempo real (para sistemas antigénicos Kidd y Dombrock) y la tecnología de chip. Aunque este desarrollo proporciona un soporte fundamental en los laboratorios de inmunohematología y en el campo de la medicina de transfusiones, la mayoría de las técnicas actualmente disponibles son inapropiadas para el análisis a amplia escala, son relativamente lentas y requieren un equipo sofisticado y costoso.

40 Las nuevas tecnologías actuales parece ser que apuntan a la automatización y simplificación y nuevos instrumentos se modifican para acelerar el proceso y maximizar la producción de datos.

45 Este último concepto resulta descriptivo de las dosis de citometría de flujo múltiples basadas en microesferas. Mediante la conjugación de varias sondas purificadas de Ag u oligonucleotídicas con distintas series de microesferas fluorescentes, pueden obtenerse sistemas analíticos muy eficaces, que permiten que se tomen numerosos analitos de una sola muestra. La cuantificación aprovecha el potencial resolutivo multiparamétrico de la citometría de flujo y la capacidad de los sistemas de tratamiento de las señales digitales que procesan los millares de señales fluorescentes generadas por las microesferas (Kellar, K.L., 2002; Kettman J.R. *et al.* 1998).

50 Las microesferas están formadas por polímeros sintéticos y se caracterizan por una diferente intensidad de fluorescencia. Varias fuentes comerciales de microesferas fluorescentes están disponibles tales como Bangs Laboratories (Fishers, IN), Duke Scientific (Palo Alto, CA), Luminex Corporation (Austin, TX), Polysciences (Warrington, PA), Seradyn (Indianápolis, IN) y Spherotech (Libertyville, IL) que ofrecen microesferas con varias dimensiones y características fluorescentes.

55 Luminex Corporation, por ejemplo, produce 100 microesferas con diferentes intensidades de fluorescencia creadas mediante la incorporación de varias relaciones de dos fluorocromos que emiten a diferentes longitudes de onda y se miden con diferentes detectores (Fulton R.J. *et al.*, 1997). Recientemente se ha desarrollado un citómetro de flujo compacto (Luminex 100), con dos fuentes de láser diseñadas para la detección de microesferas y cuantificación de fluorescencia y se ha producido una matriz de 100 microesferas coloreadas con orificios de flúor que emiten a 658 y 712 nm después de la estimulación con un láser de diodo rojo de 635 nm para complementar el sistema de láser del citómetro. (Spain M. *et al.*, 2001; Earley M.C. *et al.*, 2002). Este sistema de caracterización de analitos múltiple (LabMAP™) se ha utilizado para el análisis múltiple de varios polimorfismos de un solo nucleótido (PSN) (Ye F. *et al.*, 2001; Colinas R.J. *et al.*, 2000; Dunbar S.A. *et al.*, 2000). Los PSN son la fuente de variabilidad más abundante en el genoma humano y son por lo tanto importantes para identificar los locus específicos de determinadas

patologías o la sensibilidad de una persona hacia una enfermedad o terapia farmacológica específicas (Kellar K.L., 2003).

5 Los PSN representan también la base molecular de los polimorfismos de muchos sistemas antigénicos tales como, por ejemplo, el sistema Kidd, que es uno de los principales sistemas antigénicos eritrocitarios humanos (Olives B. *et al.*, 1997).

10 El sistema eritrocitario Kidd está definido por dos alelos específicos, Jk^a y Jk^b (Irshaid N.M. *et al.*, 1998). El polimorfismo (Jk^a/Jk^b) consiste en la sustitución de un sólo nucleótido que determina una sustitución de aminoácidos (Asp280Asn) en el nivel del cuarto bucle extracelular de la glucoproteína Kidd. El locus de Kidd (alelo Jk^a , Jk^b), situado en el cromosoma 18q11-q12, codifica una glucoproteína íntegra de la membrana que transporta la urea a través de la membrana del eritrocito y que se expresa a nivel de las células endoteliales de los vasos rectos en el riñón (Irshaid N.M. *et al.*, 1998). El carácter hereditario de Jk^a y Jk^b es codominante. Existe también un fenotipo "nulo" de Kidd (Jk (a-b-)), que procede de diferentes alteraciones genéticas (Irshaid N.M., 2000 ref. 15), que hace resistentes los eritrocitos a la lisis de urea 2 M (Sidoux-Walter F., 2000; Lucien N. *et al.*, 1998; 2002; Irshaid N.M., 2002 ref. 13).

20 Los anticuerpos anti-Kidd, a menudo son difíciles de detectar, representan un grave riesgo en el campo de la transfusión. Han estado implicados en transfusiones hemolíticas inmediatas, graves y a veces mortales, y en numerosas reacciones de transfusión hemolíticas retardadas. Estas últimas reacciones pueden ser graves y producen oligouria, problemas renales que pueden conducir a veces a la muerte. Estas especificidades con frecuencia están presentes junto con otras y tienen la característica de disminuir rápidamente a bajas concentraciones en el plasma y por lo tanto son difíciles de identificar. Se estima que aproximadamente un tercio de las reacciones hemolíticas retardadas son producidas por anticuerpos hacia los antígenos Kidd.

25 Por último, la diferente frecuencia de los alelos del gen Kidd en diferentes poblaciones puede conducir más fácilmente a la producción de anticuerpos específicos si el donante y el receptor pertenecen a diferentes grupos étnicos.

30 Cuando son necesarios donantes compatibles para pacientes con anticuerpos, la determinación del fenotipo JK por medio de procedimientos serológicos resulta determinante en los donantes de sangre.

35 A partir de lo expuesto anteriormente, existe una demanda evidente de nuevos instrumentos biotecnológicos para el genotipado de sistemas eritrocitarios que superan los límites de las técnicas adoptadas actualmente.

40 En la presente invención se han identificado actualmente sondas oligonucleotídicas específicas que, cuando se modifican adecuadamente, una vez conjugadas a un soporte sólido, tal como por ejemplo una matriz de microesferas fluorescentes, puede utilizarse con ventaja en genotipado. La modificación apropiada de las sondas oligonucleotídicas es tal que permiten su conjugación con el soporte sólido.

45 En particular, se ha desarrollado un procedimiento de genotipado de eritrocitos rápido y económico y un kit de diagnóstico relativo, que utiliza las sondas según la invención conjugadas con microesferas fluorescentes y que no presentan los inconvenientes de la técnica conocida.

50 El procedimiento anterior según la invención está, de hecho, basado en una sola reacción de ampliación seguida de hibridación lo que le hace adecuado para el tipado clínico y también el tipado de poblaciones. Una sola persona puede manejar hasta un máximo de 96 muestras en una sola sesión de funcionamiento y dos sesiones pueden realizarse el mismo día. Utilizando el procedimiento según la invención, para cada determinación, existe un considerable ahorro en términos de costes de reactivos y de tiempo (10 veces menos con respecto a otros procedimientos habituales tal como RCP).

55 Desde el punto de vista de la aplicación, el procedimiento presenta ventajas particularmente para el tipado a gran escala de muestras de sangre en cuanto facilita la obtención de sangre tipificada o rara para pacientes aloinmunizados y para pacientes que pertenecen a minorías étnicas.

60 Más particularmente, durante el presente estudio, después de identificar el polimorfismo de Kidd a nivel de los alelos Jk^a y Jk^b , se diseñaron sondas oligonucleotídicas que pueden hibridarse específicamente con los alelos Jk^a y Jk^b . Estas sondas presentan ventajas desde el punto de vista de especificidad y eficacia en el procedimiento de hibridación.

65 Las características ventajosas de las sondas oligonucleotídicas identificadas en la presente invención son las siguientes: la localización central del polimorfismo; la diferencia entre las sondas de un solo nucleótido; una proporción equilibrada entre el número de bases de guanina y citosina y el número de bases de timina y adenina para evitar el fenómeno de circularización y/o la formación de bucles.

Se ha desarrollado y probado un procedimiento rápido y eficiente para la determinación del polimorfismo en relación

con el sistema eritrocitario Kidd. Este procedimiento aprovecha el ADN diana ampliado por RCP mediante cebadores específicos que contienen el PSN del locus de Kidd y las sondas sintéticas oligonucleotídicas de captura según la invención. El procedimiento según la presente invención se probó y validó en 200 pacientes demostrando que el procedimiento es válido en su capacidad de dar a conocer exactamente el PSN de Kidd y es tolerante con respecto a la cantidad, calidad y procedencia del material que debe tiparse.

Un objeto de la presente invención se refiere por lo tanto a pares de sondas oligonucleotídicas modificados con amino en el terminal 5' caracterizados porque tienen una longitud de la secuencia que oscila entre 16 y 20 nucleótidos, preferentemente 18 nucleótidos, caracterizándose dicha secuencia porque comprende en el centro el polimorfismo de un solo nucleótido (PSN) específico de los alelos que pertenecen a un gen responsable del tipado e hibridación de eritrocitos con dichos alelos polimórficos en los que el gen es Kidd (Jk) y las sondas oligonucleotídicas modificadas por amino (modificación AmC12 en el terminal 5') constan de las siguientes secuencias:

- a) 5'-AmAGT AGA TGT CCT CAA ATG-3'
- b) 5'-AmAGT AGA TGT TCT CAA ATG-3'

o las secuencias complementarias a éstas.

Más específicamente, la sonda a) es específica para el alelo *Jka* del gen Kidd, mientras que la sonda b) es específica para el alelo *Jkb*. Las sondas según la presente invención pueden estar conjugadas con una micropartícula o conjunto de micropartículas marcadas por lo menos con una sustancia fluorescente. Las sondas están conjugadas preferentemente con una microesfera específica de la serie suministrada por Luminex Corporation. El genotipado de eritrocitos tiene lugar preferentemente por análisis múltiple con la técnica LabMAP de Luminex.

Otro objeto de la presente invención se refiere a micropartículas, preferentemente microesferas, marcadas por lo menos con una sustancia fluorescente que tienen grupos carboxílicos en la superficie, caracterizadas porque están conjugadas con el par de sondas como se definió anteriormente. Las microesferas fluorescentes utilizadas son preferentemente las de Luminex.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización del par de sondas oligonucleotídicas definido anteriormente para la identificación de eritrocitos genómicos y tipado de por lo menos un polimorfismo de un solo nucleótido del grupo sanguíneo en individuos heterocigóticos y homocigóticos. El genotipado de eritrocitos se refiere al sistema eritrocitario JK.

La presente invención también se refiere a micropartículas marcadas por lo menos con una sustancia fluorescente que tienen grupos carboxílicos en la superficie, caracterizadas porque están conjugadas con las sondas como las definidas anteriormente.

Todavía otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación y tipado genómico de eritrocitos de por lo menos un polimorfismo de un sólo nucleótido (PSN) del grupo sanguíneo en individuos heterocigóticos y homocigóticos, que comprende las fases siguientes:

- a) extracción del ADN de una muestra biológica;
- b) ampliación por RCP del gen que comprende el polimorfismo de un sólo nucleótido del sistema eritrocitario que debe analizarse por medio de cebadores específicos de los que por lo menos uno está marcado en 5' con biotina para obtener productos de RCP biotinilados (la biotinilación se efectúa preferentemente sólo a nivel del cebador directo);
- c) conjugación del par de sondas oligonucleotídicas definido anteriormente con una micropartícula o un conjunto de micropartículas marcadas por lo menos con una sustancia fluorescente, las micropartículas fluorescentes son preferentemente de Luminex Corporation;
- d) hibridación de los productos de RCP biotinilados de la fase b) con los productos conjugados de la fase c) y detección con la adición de estreptavidina-ficoeritrina;
- e) detección de la fluorescencia preferentemente con el sistema LabMAP™.

En la presente invención, el polimorfismo de un sólo nucleótido es el polimorfismo Kidd del grupo sanguíneo. Los cebadores de la fase b) presentan preferentemente las secuencias siguientes:

- i) Directo 5' -CAT GCT GCC ATA GGA TCA TTGC-3' (preferentemente con biotinilación BioTeg en el extremo 5')
- ii) Inverso 5' -GAG CCA GGA GGT GGG TTT GC-3' y el par de sondas oligonucleotídicas de la fase c) consta de las secuencias siguientes:

iii) 5' -AmC12AGT AGA TGT CCT CAA ATG-3'

iv) 5' -AmC12AGT AGA TGT TCT CAA ATG-3';

5 o las secuencias complementarias de éstas. AmC12 indica el extremo 5' modificado con amino y seguido por una cadena con 12 átomos de carbono como elemento separador en el extremo 5' y las bases en letra negra indican el polimorfismo de un sólo nucleótido.

10 La presente invención se refiere también a un kit de diagnóstico para el genotipado de eritrocitos de por lo menos un polimorfismo de un solo nucleótido (PSN) del grupo sanguíneo en individuos heterocigóticos y homocigóticos, que comprenden los compuestos siguientes:

15 a) un conjunto de cebadores para ampliación por RCP del gen que comprende el polimorfismo de un sólo nucleótido del sistema eritrocitario;

b) par de sondas oligonucleotídicas como se definió anteriormente, conjugado con una micropartícula o un conjunto de micropartículas marcadas con por lo menos una sustancia fluorescente, pudiendo dichas sondas hibridarse con dicho polimorfismo de un sólo nucleótido.

20 En la invención, el polimorfismo de un sólo nucleótido del grupo sanguíneo es Kidd. Los cebadores de la fase a) del kit según la invención presentan las secuencias siguientes:

i) Directo 5' - CAT GCT GCC ATA GGA TCA TTGC-3' (preferentemente con biotimidilación BioTeg en el extremo 5');

25 ii) Inverso 5' -GAG CCA GGA GGT GGG TTT GC-3';

y el par de sondas oligonucleotídicas de la fase b) está constituido por las secuencias siguientes:

30 iii) 5' -AmC12AGT AGA TGT CCT CAA ATG-3';

iv) 5' -AmC12AGT AGA TGT TCT CAA ATG-3';

o las secuencias complementarias de éstas.

35 La presente invención se describirá a continuación a título ilustrativo y no limitativo, a partir de su forma de realización preferida, haciendo referencia específica a las tablas adjuntas.

Ejemplo 1: Genotipado del sistema eritrocitario Kidd mediante el sistema Luminex con sondas oligonucleotídicas específicas para el alelo conjugadas con una matriz de microesferas con fluorescencia.

40 **Materiales y procedimientos**

Muestras de sangre

45 Se extrajeron 7 ml de sangre periférica de 200 donantes sanos procedentes del Blood Collection Centre del Milan Polyclinic en tubos de ensayo que contenían una solución de EDTA como anticoagulante. Las muestras se conservan a -20°C hasta el momento del tratamiento. Se utilizaron alícuotas de 200 µl de sangre completa para la extracción del ADN con un kit de purificación de ADN (QIAamp, Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá) según las instrucciones del productor. Todas las muestras tenían un serotipado conocido efectuado utilizando métodos de aglutinación convencionales para ambos antígenos. Las siguientes muestras de sangre conocidas se ensayaron: 50 muestras Jk(a+b-); 50 muestras Jk(a-b+) y 100 muestras Jk(a+b+).

Reactivos

55 Las microesferas de poliestireno COOH Xmap Multi-Analyte se adquirieron en Luminex Corporation (Austin, TX, EE.UU.).

Las microesferas (de 5,6 µm de diámetro) tienen grupos funcionales carboxílicos en la superficie para la reticulación química con diferentes analitos que, para la presente invención, son sondas de oligodesoxirribonucleótido modificadas con amino (AmC12) en el extremo 5'.

60 Las microesferas de poliestireno se clasificaron por citometría de flujo gracias al perfil de emisión en la longitud de onda naranja/rojo de cada conjunto de microesferas.

65 Pueden detectarse 100 microesferas a medida que cada conjunto incorpora sustancias colorantes en una relación exacta entre cada dos que emiten a diferentes longitudes de onda (rojo e infrarrojo) permitiéndolas que se distingan. Cada conjunto distinto de microesferas, de hecho, presenta unas características de marcado exclusivas y su propia

distribución de la intensidad de fluorescencia que puede analizarse con el instrumento de detección. En este estudio, se utilizaron las regiones nº 64, 76, 72 y 73. Los diferentes conjuntos de esferas numerados del 1 al 100 proceden del mismo material de partida y se diferencian solamente en las cantidades de colorantes marcadores presentes para la clasificación. La selección de las zonas utilizadas se efectuó siguiendo las indicaciones del productor.

Ácido 2-N-morfolin-etansulfónico (MES), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, (EDC), SAPE (100 x 0,5 mg/ml de solución madre de estreptavidina-ficoeritrina) se adquirieron en Sigma, Pierce y One Lambda, Inc. respectivamente. El SDS (dodecil-sulfato sódico) y el cloruro de tetrametilamonio (CTMA) y el tampón de lavado (SSPE-Triton X-100 Sigma) se adquirieron en Bio-RAD y Sigma, respectivamente.

Diseño de las sondas

Todos los oligonucleótidos utilizados para la asociación covalente con las microesferas se modificaron en el extremo 5' durante la síntesis, utilizando Amino-Modifier (AmC12-Qiagen Operon - Alemania). El polimorfismo de los grupos JK^a y JK^b está situado en el centro de la secuencia de las sondas.

Las sondas utilizadas son de 18 nucleótidos de longitud y se diseñaron basándose en las secuencias presentadas con los números de presentación L36121 de registro en GeneBank y PUBMED 7989337:

Sonda Jka, 5' -AmC12AGT AGA TGT CCT CAA ATG-3'
 Sonda Jkb, 5' -AmC12AGT AGA TGT TCT CAA ATG-3'
 Sonda de referencia positiva (comprimido), 5' -AmC12AGG AAG CCA AGA TCT CAA-3';
 Sonda sin sentido (NS) 5' -AmC12CGT GGA TTT CTT CAG AGG-3'.

Se diseñó la sonda de referencia positiva (CP) basándose en la secuencia presentada con los números de presentación siguientes: AF046026 de registro en GeneBank y 9734652 en PUBMED. Se efectuó la ampliación del intrón de 217 pares de bases situado en el gen JK en la posición de nucleótido 811-812. Las secuencias intrónicas son idénticas en todas las muestras a diferencia del fenotipo.

La referencia negativa se diseñó introduciendo variaciones aleatorias en la secuencia de la sonda específica para Jka.

Se utilizaron oligonucleótidos biotinilados (ODN), complementarios de los alelos JK^a , JK^b y de las referencias para ensayar la eficacia de conjugación de las sondas oligonucleotídicas a su vez modificadas en 5' con biotina. Se añadieron reactivos fluorescentes y se mezclaron para formar una mezcla para análisis múltiples.

Conjugación de sondas oligonucleotídicas con microesferas

Las cuatro sondas oligonucleotídicas diferentes modificadas en 5' (AmC12) se conjugaron en reacciones independientes con clasificaciones diferentes de microesferas carboxiladas.

Cada sonda y conjunto de microesferas carboxiladas que contienen $7,5 \times 10^6$ microesferas se microcentrifugaron a 10.000 rpm durante 2 minutos, se eliminó el sedimento y se volvió a poner en suspensión en 75 μ l de tampón MES 0,1 M, a pH 4,5. Se añadieron posteriormente a la mezcla 0,3 nanomoles de sondas oligonucleotídicas modificadas con amino.

Se añadió a continuación a la mezcla de microesferas/oligonucleótidos una solución acuosa de HCl de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC; 10 mg/ml) y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. La adición de EDC y la incubación se repitieron otra vez. Después de la incubación total de 1 hora, se lavaron las microesferas con 1,5 ml de Tween-20 al 0,02%. La solución de lavado se eliminó por microcentrifugación, se repitió el lavado 1,5 ml de SDS al 0,1% y la mezcla final se volvió a poner en suspensión en 100 μ l de TE a pH 8 y se mantuvo en la oscuridad a 4°C. Antes de su uso las esferas se llevaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Se determinó la eficacia de conjugación hibridando las microesferas conjugadas con un exceso molar de oligonucleótido biotinizado complementario (de 5 a 200 femtomoles) a una temperatura de hibridación de 45°C. Las reacciones de conjugación eficaces producen microesferas con una intensidad de fluorescencia media (IFM) comprendida entre 9.000 y 15.000.

Ampliación por RCP

La ampliación comprende un segmento de 380 pb que incluye el polimorfismo Jk en la posición 844 del nucleótido y la región intrónica de 217 pb localizada entre los nucleótidos 811-812.

Se utilizaron los cebadores siguientes para la ampliación por RCP según las instrucciones del protocolo descrito por Nidal M. Irshaid *et al.* (ref.11 *British Journal of Haematology* 1998 102, 1010-1014), con modificaciones:

ES 2 373 456 T3

JK-781-F3 (directo) 5' - (BioTEG) -CAT GCT GCC ATA GGA TCA T-3'
JK-943-R3 (inverso) 5' -GAG CCA GGA GGT GGG TTT GC-3'

El cebador directo se marcó en el extremo 5' con biotina.

5 La RCP se efectuó con 1,2 pmoles de cebador, 5-100 ng de ADN genómico, 2 nmoles, de dNTP y 0,5 U de Taq (Perkin Elmer), en el tampón suministrado. El volumen de reacción final es igual a 20 µl.

10 El sistema PCRGene Amp 9600 (Perkin Elmer Cetus) se utilizó para los ciclos térmicos en las condiciones de funcionamiento siguientes por ciclo: 10 minutos de desnaturalización inicial del ADN a 96°C, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 40 segundos, 72°C durante 40 segundos, con una fase final de alargamiento a 72°C durante 2 minutos. Los fragmentos de ADN obtenidos tienen una longitud igual a 380 pares de bases y se analizaron y comprobaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

15 Hibridación

Después de la ampliación por RCP, se transfirieron 4 µl de cada reacción a placas de microvaloración con 96 cavidades y se diluyeron con 17 µl de TE y se desnaturalizaron con calor a 99°C durante 10 minutos en un ciclador térmico precalentado. La fase de desnaturalización se bloqueó con un cubito de hielo. La hibridación de los productos biotinilados de la RCP con las cuatro clasificaciones de esferas conjugadas con ODN, se efectuó en un tampón que contenía cloruro de tetrametilamonio (TMAC) (TMAC 1,5 x 4,5 M, SDS 0,15 %, Tris-HCl 75 mM pH 8, EDTA 6 mM pH 8).

25 Se añadieron a cada muestra 33 µl de una solución de hibridación que contiene una mezcla de 5.000 esferas de cada serie conjugada con la sonda en un volumen de reacción total de 50 µl. Las muestras se mezclaron e inmediatamente se transfirieron a la placa del amplificador precalentada a 45°C. La hibridación se realizó a 45°C durante 15 minutos y las muestras se diluyeron a 150 µl con 100 µl de tampón de lavado (6 x SSPET).

30 Las fases de lavado se llevaron a cabo a temperatura ambiente por centrifugación (2.800 rpm durante 5 minutos) con la eliminación del sobrenadante utilizando una microbomba de vacío. Las muestras se lavaron 3 veces.

35 Se incubaron las esferas durante 5 minutos a 45°C con 50 µl de una solución reciente de 1 x SAPE (0,5 mg/l de estreptavidina-R-ficoeritrina) en 1 x CTMA (CTMA 3M, SDS 0,1 %, Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 4 mM pH 8). Al final de la incubación se añadieron rápidamente 100 µl de tampón de lavado a cada cavidad, las esferas se sedimentaron a continuación por centrifugación y se eliminó el sobrenadante. Cada muestra se volvió a poner en suspensión posteriormente en 80 µl de tampón de lavado (Sheath Fluid suministrado por Luminex Corporation). Para obtener unos resultados mejores, es mejor leer las muestras tan pronto como sea posible. Si la placa no puede leerse inmediatamente, las muestras pueden conservarse a 4°C en la oscuridad durante hasta un máximo de 24 horas.

40 Adquisición de datos y análisis

Se analizaron las muestras utilizando LAB Scan™ 100 (Luminex Corporation, Austin, TX).

45 El instrumento está provisto de dos fuentes de láser de las cuales un diodo de láser de 635 nm para estimular los fluorocromos clasificados en el rojo y el infrarrojo y un láser de 532 nm para estimular el fluorocromo indicador de ficoeritrina naranja.

50 Cada conjunto de esferas tiene una única distribución de intensidad de fluorescencia que puede leerse en el instrumento.

Para cada adquisición de datos se controlaron dos parámetros, el recuento y la intensidad de fluorescencia (IF).

55 El recuento debería ser mayor de 100. La intensidad de fluorescencia (IF) representa la señal PE puesta de manifiesto dentro de las esferas contadas. La IF para la sonda de referencia positiva indica la cantidad óptima de muestra y/o la calidad y la activación correcta de todas las fases de hibridación.

La adquisición de cada muestra individual debería completarse normalmente en menos de un minuto.

60 Cálculo de datos

65 La intensidad de fluorescencia (IFM - Intensidad de fluorescencia media) generada por el programa Luminex representa la IFM de cada microesfera (o sonda unida a la microesfera) para cada muestra. El valor positivo en porcentaje para cada sonda específica se calcula como relación entre el valor IFM de la sonda *Jka* o *Jkb* y el valor IFM de la sonda de referencia positiva multiplicada por 100 según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de valor positivo} = 100 \times \frac{\text{IF (n. sonda)} - \text{IF (sonda de referencia negativa)}}{\text{IF (sonda de referencia positiva)} - \text{IF}}$$

ES 2 373 456 T3

(sonda de referencia negativa)

Los valores IFM se utilizan en la fórmula, de cada uno de los cuales se sustrae el valor IFM generado a partir de la sonda de referencia negativa para cada muestra.

La reacción positiva se define como el porcentaje de valores positivos para la sonda mayor que el valor de corte establecido para la propia sonda, la reacción negativa como porcentaje de los valores positivos menores que el valor de corte.

Referencia positiva

Del análisis de los datos de 200 muestras ensayadas, el valor IFM de la referencia positiva, corregido por el valor de la referencia negativa (sonda de referencia positiva IFM - sonda de referencia negativa IFM) demuestra que tiene una IFM media con un valor de 685,5 con una desviación estándar de 179,79.

Las muestras que tienen una señal de fluorescencia de referencia positiva (IFM) que es mayor o igual a un valor de 506 se consideran fiables.

Valor de corte

Se preestableció el valor de corte para cada sonda (*Jka* y *Jkb*) utilizando un panel de 200 muestras de serotipado conocidas de las que 10 muestras con un valor heterocigótico $Jk(a+b+)$ y 50 muestras con valor homocigótico, respectivamente, para cada alelo.

El valor de corte para cada alelo se obtuvo a partir de la diferencia en el valor del porcentaje menor (calculado como se describió anteriormente) obtenido en las muestras positivas para el alelo considerado y el valor del porcentaje mayor obtenido en las muestras negativas para el alelo considerado. El valor medio obtenido de este modo representa el valor del porcentaje que define el corte de referencia para los dos alelos considerados *Jka* y *Jkb*.

A partir de los datos analíticos se obtuvieron los valores de corte siguientes (véanse las tablas 1, 2 y 3 adjuntas):

- el valor de corte para la sonda *Jka* demuestra que es igual al 10%; el valor del porcentaje menor en las muestras positivas para el alelo *Jka* (véase la tabla 1) demuestra que es igual al 29,5%; el valor del porcentaje mayor en las muestras negativas (véase la tabla 3) demuestra que es igual al 9,8%;
- el valor de corte para la sonda *Jka* demuestra que es igual al 10%; el valor del porcentaje menor en las muestras positivas para el alelo *Jka* (véase la tabla 1) demuestra que es igual al 29,5%; el valor del porcentaje mayor en las muestras negativas (véase la tabla 3) demuestra que es igual al 9,8%;
- el valor de corte para la sonda *Jkb* demuestra que es igual al 33%; el valor del porcentaje (V%) menor en las muestras positivas para el alelo *Jkb* (véase la tabla 1) demuestra que es igual al 95,1%; el valor del porcentaje mayor en las muestras negativas (véase la tabla 2) demuestra que es igual al 29,9%;

Tabla 1

Muestras de heterocigotos Jk (a+b+)								V%	V%
Nº		IFM sonda Jka		IFM sonda Jkb		IFM sonda CP	CN	Sonda Jka	Sonda Jkb
1	348	330	942,5	924,5	785,5	767,5	18	43,0	120,5
2	368	352	904	888	704	688	16	51,2	129,1
3	325	295,5	737	707,5	625	595,5	29,5	49,6	118,8
4	364,5	330,5	866,5	832,5	712,5	678,5	34	48,7	122,7
5	356	334,5	953	931,5	765,5	744	21,5	45,0	125,2
6	337	324	855,5	842,5	707,5	694,5	13	46,7	121,3
7	417	346	988,5	917,5	794	723	71	47,9	126,9
8	368,5	349,5	892	873	711,5	692,5	19	50,5	126,1
9	211	162	563	514	389	340	49	47,6	151,2
10	528	517	1266	1255	1039	1028	11	50,3	122,1
11	424	367	1004	947	827	770	57	47,7	123,0
12	217,5	159,5	358,5	300,5	301	243	58	65,6	123,7
13	176	125	446	395	285	234	51	53,4	168,8
14	244,5	185,5	624	565	505	446	59	41,6	126,7
15	402,5	341,5	979,5	918,5	744	683	61	50,0	134,5
16	367	320	961,5	914,5	712	665	47	48,1	137,5
17	381,5	313	1148	1079,5	1130	1061,5	68,5	29,5	101,7

ES 2 373 456 T3

Tabla 1 (continuación)

Muestras de heterocigotos Jk (a+b+)								V% Sonda Jka	V% Sonda Jkb
18	337	289,5	837,5	790	727,5	680	47,5	42,6	116,2
19	425	331,5	838,5	745	790	696,5	93,5	47,6	107,0
20	353,5	284,5	805	736	747	678	69	42,0	108,6
21	441	399	864,5	822,5	633,5	591,5	42	67,5	139,1
22	356	305	886	835	713,5	662,5	51	46,0	126,0
23	322	291	877	846	776	745	31	39,1	113,6
24	340	301	876,5	837,5	753,5	714,5	39	42,1	117,2
25	350,5	309	852	810,5	692	650,5	41,5	47,5	124,6
26	348	319	856,5	827,5	724	695	29	45,9	119,1
27	318	270	796	748	567,5	519,5	48	52,0	144,0
28	408	319	897	808	798	709	89	45,0	114,0
29	388	350	891,5	853,5	627	589	38	59,4	144,9
30	256	211	618,5	573,5	580	535	45	39,4	107,2
31	404	341	898,5	835,5	752	689	63	49,5	121,3
32	408,5	354,5	808,5	754,5	558	504	54	70,3	149,7
33	409	363	972,5	926,5	785	739	46	49,1	125,4
34	448,5	410	893	854,5	641	602,5	38,5	68,0	141,8
35	524,5	446,5	1044,5	966,5	832,5	754,5	78	59,2	128,1
36	582,5	494,5	1291	1203	1089	1001	88	49,4	120,2
37	654,5	571,5	1395	1312	1073	990	83	57,7	132,5
38	581	518	1219	1156	1036	973	63	53,2	118,8
39	659	548	1317,5	1206,5	1047	936	111	58,5	128,9
40	526,5	410,5	1009,5	893,5	958	842	116	48,8	106,1
41	588	506	1185,5	1103,5	985	903	82	56,0	122,2
42	520	428	1015	923	1002	910	92	47,0	101,4
43	644	523	1383	1262	1257	1136	121	46,0	111,1
44	393	271,5	1190	1068,5	1000	878,5	121,5	30,9	121,6
45	597	431	1175	1009	951	785	166	54,9	128,5
46	682	526	1056	900	918	762	156	69,0	118,1
47	553	457	1176	1080	953	857	96	53,3	126,0
48	519	370,5	1191	1042,5	937	788,5	148,5	47,0	132,2
49	492	398	947	853	835	741	94	53,7	115,1
50	593	497,5	1254	1158,5	1110	1014,5	95,5	49,0	114,2
51	563	503	1167	1107	980,5	920,5	60	54,6	120,3
52	565	505	1155	1095	1011,5	951,5	60	53,1	115,1
53	375	284,5	854,5	764	666	575,5	90,5	49,4	132,8
54	395	281	935,5	821,5	759	645	114	43,6	127,4
55	397	296,5	916,5	816	710	609,5	100,5	48,6	133,9
56	330,5	265,5	807	742	697	632	65	42,0	117,4
57	341	265	839	763	679	603	76	43,9	126,5
58	338,5	311,5	828,5	801,5	658	631	27	49,4	127,0
59	631	387,5	1045	801,5	769	525,5	243,5	73,7	152,5
60	392	260,5	805,5	674	661	529,5	131,5	49,2	127,3
61	368	226,5	832,5	691	653	511,5	141,5	44,3	135,1
62	467	296	945,5	774,5	696,5	525,5	171	56,3	147,4
63	504,5	333,5	1035	864	893	722	171	46,2	119,7
64	434	312,5	973	851,5	713	591,5	121,5	52,8	144,0
65	331,5	281,5	852	802	711	661	50	42,6	121,3
66	433,5	391	735	692,5	641,5	599	42,5	65,3	115,6
67	354,5	229,5	933,5	878,5	747	692	55	43,3	127,0
68	385	336	939	890	759	710	49	47,3	125,4
69	411	353,5	950	892,5	741,5	684	57,5	51,7	130,5
70	418,5	342,5	920	844	754	678	76	50,5	124,5
71	396	322	934	860	742	668	74	48,2	128,7
72	347	296	863	812	729	678	51	43,7	119,8
73	344	310	865	831	722	688	34	45,1	120,8
74	351	308	865,5	822,5	744,5	701,5	43	43,9	117,2

ES 2 373 456 T3

Tabla 1 (continuación)

Muestras de heterocigotos Jk (a+b+)								V% Sonda Jka	V% Sonda Jkb
75	358	326	898,5	866,5	730	698	32	46,7	124,1
76	323	284	848,5	809,5	684,5	645,5	39	44,0	125,4
77	385	339,5	972	926,5	710	664,5	45,5	51,1	139,4
78	495	406	1032,5	943,5	816	727	89	55,8	129,8
79	389,5	297,5	706,5	614,5	535,5	443,5	92	67,1	138,6
80	399,5	305,5	903,5	809,5	685,5	591,5	94	51,6	136,9
81	405,5	310,5	852	757	718	623	95	49,8	121,5
82	414	328	971	885	809	723	86	45,4	122,4
83	383,5	307,5	963	887	760,5	684,5	76	44,9	129,6
84	425	345	794,5	714,5	713	633	80	54,5	112,9
85	368	290,5	899	821,5	804,5	727	77,5	40,0	113,0
86	395	306,5	639	550,5	480	391,5	88,5	78,3	140,6
87	415	332	775	692	687,5	604,5	83	54,9	114,5
88	402	318	699,5	615,5	674	590	84	53,9	104,3
89	365	277	876	788	714	626	88	44,2	125,9
90	422,5	342,5	921	841	779,5	699,5	80	49,0	120,2
91	440	359	903	822	729,5	648,5	81	55,4	126,8
92	430	333	782	685	788,5	691,5	97	48,2	99,1
93	369,5	250,5	675	556	518	399	119	62,8	139,3
94	416	320,5	836	740,5	874	778,5	95,5	41,2	95,1
95	430	297	942	809	745	612	133	48,5	132,2
96	456,5	391,5	755	690	516	451	65	86,8	153,0
97	427,5	354,5	852	779	553,5	480,5	73	73,8	162,1
98	402,5	348,5	909	855	672	618	54	56,4	138,3
99	379,5	338,5	927	886	723	682	41	49,6	129,9
100	431,5	386,5	977	932	829,5	784,5	45	49,3	118,8

5

Tabla 2

Muestras Jk (a+b-)		IFM sonda Jkb	IFM sonda CP	V% sonda Jka	V% sonda Jkb
Nº	IFM sonda Jka				
1	591	95	863,5	68,4	11,0
2	590	108	958	61,6	11,3
3	556,5	74,5	754	73,8	9,9
4	556	84	835	66,6	10,1
5	550,5	79	815,5	67,5	9,7
6	495	84,5	792	62,5	10,7
7	591	111	892,5	66,2	12,4
8	547	79	755	72,5	10,5
9	610	99	920	66,3	10,8
10	475	85	774	61,4	11,0
11	510	93	736,5	69,2	12,6
12	523	102	761,5	68,7	13,4
13	504	87	732	68,9	11,9
14	463	73	697,5	66,4	10,5
15	559	95	786,5	71,1	12,1
16	545,5	114	748,5	72,9	15,2
17	556	127	1190,5	46,7	10,7
18	777	166,5	1524	51,0	10,9
19	397	68,5	611	65,0	11,2
20	743	130	978	76,0	13,3
21	811,5	154,5	1148	70,7	13,5
22	766,5	142,5	1074,5	71,3	13,3
23	687	116	982,5	69,9	11,8
24	729	137	1093	66,7	12,5
25	666	127	1044	63,8	12,2

ES 2 373 456 T3

Tabla 2 (continuación)

Muestras Jk (a+b-)		IFM sonda Jkb	IFM sonda CP	V% sonda Jka	V% sonda Jkb
Nº	IFM sonda Jka				
26	231	63,5	367	62,9	17,3
27	647	105	547,5	123,1	19,2
28	675,5	120	889	76,0	13,5
29	454	97	763	59,5	12,7
30	551	90,5	774	71,2	11,7
31	434,5	80	660,5	65,8	12,1
32	468,5	110,5	597	78,5	18,5
33	420	71,5	566	74,2	12,6
34	496,5	87	639,5	77,6	13,6
35	511,5	92	809,5	63,2	11,4
36	594,5	88,5	802,5	74,1	11,0
37	434,5	113	710	61,2	15,9
38	688	86	649	106,0	13,3
39	566,5	92	798	71,0	11,5
40	574,5	239	800	71,8	29,9
41	584	87	588	99,3	14,8
42	592	102	816	72,5	12,5
43	533	108	852	62,6	12,7
44	617	108	888,5	69,4	12,2
45	487	66	469	103,8	14,1
46	566	100	784,5	72,1	12,7
47	625,5	116,5	857,5	72,9	13,6
48	625	107	877,5	71,2	12,2
49	572,5	66	563	101,7	11,7
50	553,5	75	567,5	97,5	13,2

5

Tabla 3

Muestras Jk (a-b+)		IFM sonda Jkb	IFM sonda CP	V% sonda Jka	V% sonda Jkb
Nº	IFM sonda Jka				
1	33,5	989	613	5,5	161,3
2	6	1212	537	1,1	225,7
3	-5	1188	531	0,9	223,7
4	14,5	1173	553	2,6	212,1
5	23,5	1255,5	717	3,3	175,1
6	22	1445	694	3,2	208,2
7	24	1319	586	4,1	225,1
8	29	1590	692,5	4,2	229,6
9	28	1226	576,5	4,9	212,7
10	32	1318,5	624	5,1	211,3
11	36	1236,5	645	5,6	191,7
12	35	1377	634,5	5,5	217,0
13	30,5	1241	600	5,1	206,8
14	26,5	1149	621,5	4,3	184,9
15	25,5	1214	548	4,7	221,5
16	26	1186	504	5,2	235,3
17	12	507	243,5	4,9	208,2
18	12	741,5	393,5	3,0	188,4
19	8	1029,5	474,5	1,7	217,0
20	49	1502	713	6,9	210,7
21	46	1226,5	591,5	7,8	207,4
22	30,5	1690,5	851	3,6	198,6
23	24,5	1365	664	3,7	205,6
24	53	1493	738,5	7,2	202,2
25	36	1758,5	964,5	3,7	182,3
26	15	1235,5	573	2,6	215,6
27	21,5	1187	533,5	4,0	222,5

Tabla 3 (continuación)

Muestras Jk (a-b+)		IFM sonda Jkb	IFM sonda CP	V% sonda Jka	V% sonda Jkb
Nº	IFM sonda Jka				
28	14,5	1166	395,5	3,7	294,8
29	15	1153	498	3,0	231,5
30	10	1222,5	592,5	1,7	206,3
31	28	1191	516	5,4	230,8
32	13,5	1077,5	416	3,2	259,0
33	12	1019	462	2,6	220,6
34	28	1314	500	5,6	262,8
35	15,5	1241,5	542,5	2,9	228,8
36	18,5	1227	543,5	3,4	225,8
37	20	1089,5	573	3,5	190,1
38	22	1413	568,5	3,9	248,5
39	21	1100,5	376	5,6	292,7
40	17,5	1375,5	609,5	2,9	225,7
41	27	1427,5	631	4,3	226,2
42	26	1475,5	683	3,8	216,0
43	20,5	1356,5	609,5	3,4	222,6
44	22	1198	611	3,6	196,1
45	22	1436,5	644,5	3,4	222,9
46	23	1290	553	4,2	233,3
47	34	1101	363	9,4	303,3
48	18,5	1539,5	558	3,3	275,9
49	46	1321	613	7,5	215,5
50	59,5	1506,5	605,5	9,8	248,8

5 **Bibliografía**

- Colinas RJ, Bellisario R, Pass KA. Clinical Chemistry 2000; 46 n. 7: 996-998.
- Dunbar SA, Jacobson JW. Clinical Chemistry 2000; 46 n. 9: 1498-1500.
- 10 - Earley MC, Vogt RF, Shapiro HM, Mandy FF, Kellar KL, Bellisario R, Pass KA, Marti GE, Stewart CC, Hannon WH. Cytometry (Clinical Cytometry) 2002; 50: 239-242.
- Kellar KL, Iannone MA. Exp. Hematol. 2002; 30:1227-1237.
- 15 - Kellar KL. Journal of Clinical Ligand Assay 2003; 26 n.2: 82-92.
- Iannone MA, Taylor JD, Chen J, Li MS, Rivers P, Slentz-Kesler KA, Weiner M. Cytometry 2000; 39: 131-140.
- 20 - Fulton JR, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR. Clinical Chemistry 1997; 43 n.9: 1749-1756.
- Taylor JD, Briley D, Nguyen Q, Long K, Iannone MA, Li MS, Ye F, Afshari A, Lai E, Wagner M, Chen J, Weiner MP. Biotechniques 2001; 30: 661-669.
- 25 - Armstrong B, Stewart M, Mazumder A. Cytometry 2000; 40: 102-108.
- Kettman JR, Davies T, Chandler D, Oliver KG, Fulton RJ. Cytometry 1998; 33: 234-243.
- Defoort JP, Martin M, Casano B, Prato S, Camilla C, Fert V. Journal of Clinical Microbiology 2000; 38 n.3: 1066-1071.
- 30 - Irshaid NM, Thuresson B, Olsson ML. British Journal of Haematology 1998; 102: 1010-1014.
- Lucien N, Chiarori J, Cartron JP, Bailly. Blood 2002; 99: 1079-1081.
- 35 - Irshaid NM, Eicher NI, Hustinx H, Poole J, Olsson ML. British Journal of Haematology 2002; 116: 445-453.
- Sidoux-Walter F, Lucine N, Nissinen Riikka, Sistonen P, Henry S, Moulds J, Cartron JP, Bailly P. Blood 2000; 96 n.4; 1567-1573.

- Irshaid NM, Henry SM, Olsson ML. *Transfusion* 2000; 40: 69-74.
- 5 - Lucien N, Sidoux WF, Olives B, Moulds J, Le Pennec PY, Cartron JP, Bailly P. *Issue* 1998; 273 n.21: 12973-12980.
- Olives B, Merriman M, Bailly P, Bain S, Barnett A, Todd J, Cartron JP, Merriman T. *Human Molecular Genetics* 1997; 6 n.7: 1017-1020.
- 10 - Hessner MJ, Pircon RA, Johnson ST, Luhm RA. *Prenatal Diagnosis* 1998; 18: 1225-1231.
- Spain M, Jacobson J. *Amer Genomics/Proteomics Technol.* 2001; 47: 1241-1256
- Ye F, Li M-S, Taylor JD. *Hum. Mutat* 2001; 17: 305-316.

REIVINDICACIONES

1. Par de sondas oligonucleotídicas modificado con amino en el terminal 5' que presenta una longitud de la secuencia comprendida entre 16 y 20 nucleótidos, estando dicha secuencia caracterizada porque comprende, en el centro, el polimorfismo de un solo nucleótido (PSN) específico de las variantes alélicas del gen que codifica dicho polimorfismo y dichas sondas oligonucleotídicas que hibridan con dichos alelos, en el que dicho gen es el gen Kidd y dichas sondas están constituidas por las secuencias siguientes:
- 5 a) 5' -AmC12AGT AGA TGT CCT CAA ATG-3' (SEC. ID. nº 1);
 10 b) 5' -AmC12AGT AGA TGT TCT CAA ATG-3' (SEC. ID. nº 2);
- o las secuencias complementarias a éstas.
2. Par de sondas según la reivindicación 1, en el que dichas sondas están conjugadas con una micropartícula o un conjunto de micropartículas marcadas con por lo menos una sustancia fluorescente.
- 15 3. Utilización del par de sondas oligonucleotídicas definido en las reivindicaciones 1 y 2 para la identificación y el tipado eritrocitario genómico de por lo menos un polimorfismo de un solo nucleótido del grupo sanguíneo en individuos heterocigóticos y homocigóticos.
- 20 4. Micropartículas marcadas con por lo menos una sustancia fluorescente que presentan grupos carboxílicos en la superficie, caracterizadas porque están conjugadas con las sondas como las definidas en las reivindicaciones 1 y 2.
5. Procedimiento para la identificación y el tipado de por lo menos un polimorfismo de un sólo nucleótido (PSN) del grupo sanguíneo Kidd en individuos heterocigóticos y homocigóticos, que comprende las fases siguientes:
- 25 a) extracción del ADN de una muestra biológica;
- b) ampliación por RCP del fragmento de gen que comprende el polimorfismo de un sólo nucleótido del sistema eritrocitario que debe analizarse por medio de cebadores específicos de los que por lo menos uno está marcado en el extremo 5' con biotina para obtener productos biotinilados de RCP;
- 30 c) conjugación del par de sondas oligonucleotídicas como se ha definido en la reivindicación 1 con una micropartícula o un conjunto de micropartículas marcadas con por lo menos una sustancia fluorescente;
- 35 d) hibridación de los productos de RCP biotinilados de la fase b) con los productos conjugados de la fase c) y la detección con la adición de estreptavidina-ficoeritrina;
- e) detección de la fluorescencia.
- 40 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que los cebadores de la fase b) presentan las secuencias siguientes:
- 45 i) 5' -CAT GCT GCC ATA GGA TCA TTGC-3' Directo (SEC. ID. nº 3);
 ii) 5' -GAG CCA GGA GGT GGG TTT GC-3' Inverso (SEC. ID. nº 4).
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en el que el cebador i) está biotinilado en el extremo 5'.
- 50 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el conjunto de micropartículas fluorescentes son de Luminex Corporation.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la detección de la fluorescencia se efectúa con el sistema LabMAP™.
- 55 10. Kit de diagnóstico para la identificación y el tipado de por lo menos un polimorfismo de un solo nucleótido (PSN) del sistema eritrocitario Kidd en individuos heterocigóticos y homocigóticos, que comprende los compuestos siguientes:
- 60 a) un conjunto de cebadores para la ampliación por RCP del fragmento de gen que comprende el polimorfismo de un sólo nucleótido del sistema eritrocitario considerado;
- b) pares de sondas oligonucleotídicas como se definió según la reivindicación 1, conjugados con una micropartícula o un conjunto de micropartículas marcadas con por lo menos una sustancia fluorescente, pudiendo dichas sondas hibridarse con dicho polimorfismo de un sólo nucleótido.
- 65

11. Kit de diagnóstico según la reivindicación 10, en el que los cebadores de la fase a) presentan las secuencias siguientes:

- 5 i) 5' -CAT GCT GCC ATA GGA TCA TTGC-3' Directo (SEC. ID. nº 3);
ii) 5' -GAG CCA GGA GGT GGG TTT Inverso GC-3' (SEC. ID. nº 4).

12. Kit de diagnóstico según la reivindicación 11, en el que el cebador i) está biotinilado en el extremo 5'.