

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 072**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2005 E 05767635 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1745290**

54 Título: **Utilización de ferrofluidos para el fenotipaje sanguíneo y aplicaciones derivadas**

30 Prioridad:

05.05.2004 FR 0404853

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.12.2013

73 Titular/es:

**DIAGAST (100.0%)
EURASANTE PARC, 251, AVENUE EUGENE
AVINEE
59120 LOOS, FR**

72 Inventor/es:

**BARBREAU, YVES;
BOULET, OLIVIER;
BOULET, ARNAUD;
DELANOE, ALEXIS;
FAUCONNIER, LAURENCE;
PELOSIN, JEAN-MARC y
SOUFFLET, LAURENT**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 435 072 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

Utilización de ferrofluidos para el fenotipaje sanguíneo y aplicaciones derivadas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de fenotipaje de grupo sanguíneo, que utiliza una solución acuosa de ferrofluido obtenido a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y de por lo menos un metal M(II) de grado II de oxidación. La invención comprende también un dispositivo y un kit que permiten realizar dicho procedimiento.

10 La transfusión sanguínea consiste hoy día en administrar por vía intravenosa unas preparaciones de concentrado de glóbulos rojos (concentrados globulares) obtenidas a partir de sangre de donantes.

15 Durante una transfusión sanguínea, el primer riesgo está relacionado con la posibilidad de reunir en el organismo del receptor (persona transfundida) un anticuerpo y su antígeno eritrocitario. En efecto, en la superficie de los eritrocitos, denominados también glóbulos rojos o hematíes, se encuentran unos antígenos membranaarios eritrocitarios, en particular unos antígenos de grupo (o sistema) sanguíneo, capaces de ser reconocidos por el sistema inmunitario y desencadenar una respuesta inmune.

20 Los glóbulos rojos del donante son denominados compatibles con la sangre del receptor si el receptor no presenta anticuerpos circulantes dirigidos contra un antígeno eritrocitario del donante.

25 Entre el conjunto de las variantes antigénicas de un antígeno membranaario eritrocitario que constituyen los grupos sanguíneos, se han identificado hoy día más de veinte sistemas antigénicos eritrocitarios en el ser humano: sistema ABO con los antígenos A o B, sistema Rhesus con el antígeno D, E o e y C o c, sistema Kell con el antígeno K o k, Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb) o también otros sistemas buscados menos frecuentemente en la práctica que existen también tales como MNS, Lewis, etc. Los individuos que presentan una misma asociación de antígenos eritrocitarios pertenecen a un mismo grupo sanguíneo eritrocitario. Los grupos sanguíneos son tanto más complejos y numerosos si utilizan varios sistemas antigénicos.

30 Aparte de la situación patológica, tal como en el caso de la enfermedad autoinmune, el suero de un individuo puede contener dos tipos de anticuerpos dirigidos contra unos antígenos eritrocitarios.

35 (i) los anticuerpos denominados regulares y dirigidos contra los antígenos del sistema ABO (por ejemplo anticuerpos anti-A en el individuo de grupo B). Se trata de inmunoglobulinas de tipo IgM que son capaces de aglutinar los glóbulos rojos *in vitro*. Este fenómeno se aprovecha para determinar el grupo ABO de un individuo por las pruebas de Beth-Vincent y Simonin, permitiendo la prueba de Beth-Vincent determinar los antígenos transportados por sus glóbulos rojos (fenotipo antigénico) y permitiendo la prueba de Simonin realizar el estudio complementario, es de decir determinar los anticuerpos anti-A y/o anti-B circulantes presentes en el suero del individuo.

40 En la prueba de Beth-Vincent, los glóbulos rojos del individuo se ponen en contacto con sueros de ensayo, o anticuerpos de ensayos, que poseen cada uno un tipo de anticuerpo preciso, dirigido contra un antígeno del sistema ABO. Se trata por lo tanto de una prueba de aglutinación de los glóbulos rojos con unos sueros de ensayo.

45 En la prueba de Simonin, denominada también contraprueba, el suero del individuo, que contiene sus anticuerpos circulantes, se pone en contacto con glóbulos rojos de ensayos, o eritrocitos de ensayos, que pertenecen cada uno a un grupo antigénico preciso del sistema ABO. Se trata por lo tanto de un ensayo de aglutinación del suero con unos glóbulos rojos de ensayo;

50 (ii) los anticuerpos denominados irregulares (o inmunes) cuya presencia en el suero o plasma es facultativa y que están dirigidos contra unos antígenos de los sistemas no ABO. Se trata lo más frecuentemente de IgG que aparecen con motivo de una estimulación antigénica por unos glóbulos rojos extraños, por ejemplo tras una inmunización contra uno o varios antígenos durante una transfusión sanguínea o también durante un embarazo, por reacción inmunitaria maternal dirigida contra los antígenos eritrocitarios fetales que no pertenecen al grupo sanguíneo maternal, en particular durante el parto.

55 La búsqueda de estos anticuerpos denominados irregulares se denomina Búsqueda de Aglutinina Irregular (RAI). Este ensayo se utiliza para detectar la presencia o no en la sangre de un individuo de IgG dirigidos contra diversos antígenos eritrocitarios. Para ello, se busca poner en evidencia la fijación de estas IgG sobre unos glóbulos rojos ensayos de los cuales se conocen los antígenos. Se procede en paralelo sobre numerosos tipos de glóbulos rojos, permitiendo la comparación de los resultados deducir la o las IgG presentes.

60 El riesgo es más importante para los antígenos más inmunógenos, como el Rh D pero también los otros Rh (E>c>e>C), el Kell (K), el Duffy (Fy, a, Fy, b), el Kidd (Jka, Jkd, b), etc.

En la práctica, no se puede tener en cuenta todos estos antígenos para realizar una transfusión, de lo contrario no se dispondría jamás del grupo adecuado sanguíneo en el mejor momento, sobre todo porque algunas asociaciones antigénicas son muy raras. La transfusión estándar no tiene en cuenta el grupo en el sistema ABO más el Rh D (Rh+ o Rh-). En las situaciones con riesgo de aparición de una aglutinina irregular, se tiene en cuenta un cierto número de otros sistemas, en particular los Rh C y E, y el Kell, incluso aún otros sistemas. Se trata entonces, en estas situaciones con riesgos, de respetar la compatibilidad del grupo sanguíneo del donante con el de la sangre del receptor, teniendo en cuenta la presencia o el riesgo de aparición de estas aglutininas irregulares.

Así, en un paciente receptor portador de anticuerpos irregulares anti-eritrocitarios o en una situación de riesgo como, en particular, en los pacientes politransfusionados que no poseen anticuerpos irregulares anti-eritrocitarios y en la mujer embarazada, es indispensable seleccionar las unidades de concentrados eritrocitarios que van a ser transfusionados, de tal manera que los glóbulos rojos del donante deberán estar desprovistos de antígenos contra los cuales los anticuerpos del receptor son dirigidos o susceptibles de aparecer. Esta prueba de compatibilidad es obligatoria en estos pacientes y de manera preventiva en todos los receptores antes de la administración de los concentrados eritrocitarios, efectuando una prueba de compatibilidad directa con los hematíes del donante en presencia del suero o plasma del receptor. No se debe observar ninguna reacción de aglutinación y/o de lisis en las técnicas utilizadas para la RAI.

En la práctica clínica transfusional, el fenotipaje eritrocitario, que corresponde a la búsqueda y a la identificación de los antígenos de grupo sanguíneo en la superficie de los hematíes (con la excepción del sistema particular ABO en el que se busca además la presencia de los anticuerpos regulares correspondientes), se refiere asimismo tanto el receptor como el donante.

A nivel del receptor y del donante, existen tres niveles de fenotipo eritrocitario, a fin de poner a disposición del receptor unos concentrados eritrocitarios compatibles en función de las situaciones de riesgo:

- la determinación del fenotipo del grupo ABO (o agrupamiento ABO) y Rh estándar (presencia o ausencia del antígeno D);
- la determinación del fenotipo Rh Kell (presencia o ausencia de los antígenos C, E, c, r y K); y
- la determinación del fenotipo extendido (o ampliado) (presencia o ausencia de los antígenos del sistema Duffy, Fy a y Fy b, del sistema Kidd, Jk a y Jk b, y del sistema MNSs (antígenos S y s), pudiendo buscarse además otros antígenos según la naturaleza del riesgo y/o del anticuerpo irregular puesto en evidencia en el suero del receptor.

Las técnicas habitualmente utilizadas, realizadas para buscar e identificar la presencia o la ausencia de antígeno de grupo sanguíneo en la superficie de eritrocito del donante y/o del receptor, o que tienen como objetivo buscar e identificar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-antígeno de grupo sanguíneo, regular (para el grupo ABO) o irregular en el ámbito de la RAI en el suero o plasma del donante y/o del receptor, son bien conocidas por el experto en la técnica y no se describirán aquí.

Para el fenotipaje, estas consisten en general en buscar con la ayuda del suero-ensayo que contiene los anticuerpos apropiados la presencia o la ausencia del antígeno buscado. Preferentemente, estos anticuerpos contenidos en estos sueros de ensayo son de naturaleza aglutinante (IgM o IgA), lo que permite obtener una aglutinación total o parcial de los eritrocitos a fenotipar cuando estos últimos llevan el antígeno que corresponde al anticuerpo presente en el suero de ensayo. Sin embargo, es posible utilizar unos anticuerpos de ensayo no aglutinantes (de tipo IgG), siendo la aglutinación provocada por medio de una anti-inmunoglobulina (técnica denominada de Coombs indirecto) o siendo la presencia de anticuerpos de ensayo no aglutinantes fijados sobre el glóbulo rojo, visualizada por medio de una anti-inmunoglobulina fijada sobre una fase sólida. La lectura de la aglutinación o de los glóbulos rojos sensibilizados con el anticuerpo de ensayo fijados sobre la fase sólida por medio de la anti-inmunoglobulina (técnica denominada de inmunoadherencia), podrá ser realizada a ojo o mediante de un lector apropiado.

Para la búsqueda y la identificación en la muestra de suero o plasma, del paciente a ensayar, de anticuerpos anti-antígeno de grupo sanguíneo, regulares para el grupo ABO o irregulares en el ámbito de la RAI, se pone en general en contacto un suero o un plasma del paciente con unos eritrocitos de ensayo (denominados también hematíes, o glóbulos rojos de ensayo, de antigenicidad conocida en un cierto número de sistemas de grupo sanguíneo (ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNSs, etc.). Para la RAI, para la cual los anticuerpos susceptibles de estar presentes son más bien de tipo no aglutinantes, las técnicas utilizadas son de tipo Coombs indirecto por aglutinación por medio de una anti-inmunoglobulina o por inmunoadherencia sobre una fase sólida recubierta de una anti-inmunoglobulina.

Para la RAI, se utiliza en una primera etapa un panel de glóbulos rojos denominados de diagnóstico (dos o tres glóbulos rojos de grupo diferente seleccionados de manera que comprendan el máximo de antígenos) que permiten detectar (pero no identificar) la presencia o la ausencia de anticuerpos irregulares. Cuando el diagnóstico es positivo, se realiza entonces la identificación de la especificidad del o de los anticuerpos irregulares presentes mediante por lo menos un panel de glóbulos rojos denominados de identificación, que comprende en general 10 glóbulos rojos

diferentes fenotipados en la gran mayoría de los sistemas de grupos sanguíneos conocidos.

Se puede señalar asimismo que durante la prueba de compatibilidad en la que los hematíes del donante se ponen en contacto con el suero del receptor, se efectúa en general en una primera etapa de centrifugación a fin de observar la presencia eventual de una aglutinación relacionada con la presencia en el suero del receptor de anticuerpos que aglutinan los glóbulos rojos del donante (incompatibilidad de tipo ABO o anticuerpos irregulares de tipo IgM o IgA), estando esta primera etapa seguida, si no hay aglutinación, de una búsqueda de anticuerpos mediante una anti-inmunoglobulina (técnica de Coombs indirecta a la anti-globulina).

Existe un gran número de variantes de las técnicas utilizadas para el fenotipaje o la RAI en el campo de la transfusión sanguínea, pudiendo estas técnicas ser manuales, sobre placa de opalina, en tubo o en cúpula de microplaca, o completamente automatizadas con la ayuda de robot distribuidor de muestra y de reactivo, agitador, incubador, y lector automático, cuyos programas son adaptados a las técnicas realizadas.

Entre las técnicas utilizadas, se pueden citar las técnicas para las cuales la presencia de anticuerpos anti-antígeno de grupo sanguíneo o de antígeno de grupo sanguíneo está basada en la puesta en evidencia de una aglutinación de glóbulos rojos después de la centrifugación que utiliza una mini columna de filtración transparente (gel tipo "sephadex[®]" o microperlas), cuyo ensanchado en el extremo superior sirve de cámara de incubación, y cuyo límite de corte seleccionado para la columna impide a los hematíes aglutinados después de la centrifugación atravesar la columna (véanse en particular los documentos de patente EP 0 194 212 o de patente EP 0 755 719).

Se pueden citar asimismo las técnicas para las cuales el fenotipaje o la RAI está basado en la puesta en evidencia de glóbulos rojos sensibilizados con un anticuerpo después de la centrifugación y después de la inmunoadherencia que utiliza una barrera de separación constituida de un gel o de un líquido cuya densidad se selecciona, de tal manera que sólo los glóbulos rojos puedan atravesar esta barrera durante una centrifugación, estando el contenedor de reacción recubierto, en su parte inferior, de una anti-inmunoglobulina a fin de atrapar los glóbulos rojos sensibilizados y dar una imagen característica. Entre estas técnicas, se puede citar el documento de patente EP 0 058 780, que describe un procedimiento de fenotipaje sanguíneo en el que la mezcla de reacción está centrifugada a través de un cojinete de densidad superior (de tipo solución de albúmina bovina o de polivinilpirrolidona), lo que presenta la ventaja de suprimir la etapa de lavado de los hematíes sensibilizados. Se puede citar asimismo el documento WO 98/02752, que describe un procedimiento general para determinar la presencia de un antígeno sanguíneo presente en eritrocitos o de un anticuerpo que fija tal antígeno. En este procedimiento, los eritrocitos sensibilizados o no, son separados de los anticuerpos no fijados por centrifugación gracias a un medio de separación cuya densidad es superior a la del líquido que contiene los anticuerpos, pero inferior a la de los eritrocitos, estando los eritrocitos sensibilizados separados de los eritrocitos no sensibilizados sobre la pared inferior del contenedor de reacción sobre el cual se inmoviliza una anti-inmunoglobulina, estando los eritrocitos no sensibilizados reunidos en el fondo del contenedor, siendo el análisis de la imagen final obtenida específico de la presencia o no del analito buscado.

Entre las variantes de las técnicas utilizadas para el fenotipaje o la RAI, se pueden citar asimismo las que se han desarrollado de manera general para la búsqueda en una muestra de un analito capaz de fijarse sobre una célula utilizando unas partículas magnéticas, en particular a fin de suprimir la centrifugación, operación necesaria en particular en las técnicas basadas en la aglutinación como la técnica con antiglobulina (Coombs indirecto por aglutinación o por inmunoadherencia sobre fase sólida) para la RAI o también para el fenotipaje, o también, como para la RAI, cuando es necesario lavar los glóbulos rojos sensibilizados a fin de eliminar los anticuerpos no específicos capaces de reconocer la anti-inmunoglobulina utilizada en la etapa siguiente.

En efecto la etapa de centrifugación es siempre difícil de realizar en los procedimientos que se desea automatizar totalmente, en particular debido al coste y al volumen de las centrifugadoras, su manipulación, etc.

Las partículas magnéticas se utilizan desde hace muchos años para la detección de complejos de tipo ligando-receptor o anticuerpos-antígeno, se pueden citar por ejemplo los procedimientos tales como los descritos en los documentos de patente siguientes:

- el documento WO 92/17781, que describe un método de determinación de la presencia de un ligando en una muestra en la que se incuban unas partículas de látex magnéticas, que pueden ser de colores diferentes, revestidas de una sustancia, tal como un anticuerpo, capaz de fijarse a este ligando, y después se aplica un campo magnético al medio de incubación y finalmente se observa la presencia o la ausencia de la aglutinación; o también
- el documento EP 0 426 170 que describe un método de determinación de la presencia de un ligando en una muestra, método en el que se incuban unas partículas de gelatina magnéticas sensibilizadas con unos antígenos o unos anticuerpos capaces de fijarse con este ligando, y después se aplica un campo magnético al medio de incubación, y finalmente se observa la presencia o la ausencia de aglutinación, estando dicho método caracterizado porque se observa el estado de deslizamiento de estas partículas después de la inclinación del contenedor, en particular una cúpula de microplaca con fondo en V.

Tales partículas magnéticas se han utilizado ya en inmunohematología para el fenotipaje y/o la RAI. Entre los documentos que describen tales aplicaciones, se pueden citar en particular:

- 5 - el documento EP 0 351 857 que describe un procedimiento de dosificación inmunológica que utiliza unos marcadores magnetizados, tales como unos anticuerpos o unos antígenos fijados sobre unas bolas de látex magnéticas. Estos marcadores son capaces de unirse a una sustancia que se desea determinar en una etapa de inmunorreacción, y se reúnen después las partículas magnéticas al marcador sobre una región predeterminada de la superficie de una pared en un recipiente de medición con la ayuda de un imán
- 10 posicionado bajo esta cúpula y bajo la acción de un campo magnético, pudiendo este procedimiento comprender una sustancia que puede unirse específicamente a la sustancia a determinar inmovilizada sobre una región predeterminada de la superficie de la pared del recipiente de medición. En particular, se describe una técnica RAI por inmunoadherencia en la que unos eritrocitos previamente fijados al fondo de una cúpula de microplaca son después sensibilizados con el suero del receptor, y después lavados (por aspiración e inyección del líquido de lavado), y después se añaden en dicha cúpula las bolas de látex magnéticas revestidas de una anti-inmunoglobulina antes de aplicar un campo magnético;
- 15 - el documento EP 0 528 708 que describe un procedimiento de detección por inmunoadherencia de una sustancia biológica susceptible de estar presente en una muestra. En este procedimiento, los eritrocitos a fenotipar o que sirven de panel de diagnóstico y/o de identificación son fijados previamente sobre el fondo de una microplaca. Después de la sensibilización de los eritrocitos así fijados con el suero de ensayo (para el fenotipaje) o el suero del receptor a ensayar (para la RAI), las cúpulas son lavadas y se añaden después unas bolas de látex magnéticas revestidas de anti-inmunoglobulina. En este procedimiento, se aplican en particular dos tipos de campos magnéticos sucesivos (de tipo vertical y circular) a fin de desplazar las
- 20 partículas magnéticas no unidas específicamente con la sustancia a buscar; y
- 25 - el documento de patente EP 0 230 768 que describe un procedimiento de co-agregación de partículas magnéticas capaz de unirse a una sustancia contenida en una muestra por medio de compuestos policatiónicos o polianiónicos en presencia de un campo magnético. Este documento describe en particular la separación del plasma de una muestra de sangre total que contiene unos glóbulos rojos, procedimiento en el que se añade secuencialmente en un contenedor colocado sobre un imán la muestra de sangre total y un ferrofluido ($\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$) revestido de albúmina bovina sérica succinilada, siendo los agregados de partículas de eritrocitos así obtenidos arrastrados hacia el imán, permitiendo así recuperar el plasma clarificado por decantación. En este documento, se describe asimismo un procedimiento que permite cuantificar la presencia de un anticuerpo anti-RH (anti-D) en una muestra de plasma preparada según el procedimiento anterior, la cual está incubada en presencia de una suspensión de glóbulos rojos RH+ fluorescentes y a cuya mezcla se añade después y secuencialmente el ferrofluido succinilado y polibreno, siendo los glóbulos rojos lavados varias veces por aplicación de un campo magnético y decantación antes de la adición de una anti-inmunoglobulina. La cuantificación del anticuerpo anti-RH en la muestra de plasma se evalúa por comparación con controles analizando las fluctuaciones de cantidad de fluorescencia observada en un volumen dado.
- 30 - el documento de patente EP 0 348 191 describe un procedimiento de determinación de la presencia de un ligando unido a la superficie de un primer tipo de partículas en un medio líquido. Este procedimiento comprende el suministro, en combinación, de un medio líquido susceptible de contener un ligando unido a la superficie de un primer tipo de partículas, unos medios para aglutinar las partículas en relación con la presencia de dicho ligando, de un segundo tipo de partículas que posee un ligando idéntico o diferente al primero, y de medios para aglutinar el segundo tipo de partículas. La aglutinación del primero y del segundo tipo de partículas es detectable distintamente por medición espectroscópica. El medio se incuba y la aglutinación de cada una de las partículas se determina espectroscópicamente sin separar los primeros y los segundos tipos de partículas.
- 35 - el documento WO 02/40159 que describe un dispositivo que permite aplicar un campo magnético a una placa de microtitulación, comprendiendo dicho dispositivo un sustrato y una pluralidad de elementos magnéticos dispuestos sobre dicho sustrato, estando dichos elementos magnéticos ordenados en paralelo los unos de los otros de manera que el eje longitudinal de cada elemento magnético está aproximadamente centrado bajo una línea o una columna de pocillo cuando la placa está colocada.
- 40 - el documento WO 02/46758 que describe un procedimiento de magnetización de marcadores químicos o biológicos con la ayuda de partículas magnéticas. Este procedimiento comprende las etapas que consisten en: 1) activar las partículas magnéticas a fin de modificar su estado de superficie, 2) poner en contacto las partículas magnéticas activadas con los marcadores, para crear unas uniones no específicas entre sí. Dichos marcadores activados pueden ser utilizados como reactivos o analitos en un ensayo de análisis biológico.
- 45 Si estas últimas técnicas que utilizan unas bolas magnéticas revestidas de anti-inmunoglobulina o un ferrofluido modificado permiten librarse de las etapas de centrifugación, estas necesitan la utilización de fases sólidas
- 50
- 55
- 60
- 65

5 previamente revestidas de glóbulos de ensayos o a fenotipar, poco estables y que deben ser preparadas por el usuario final. Por otro lado, véase en particular el documento EP 0 230 768, la utilización de ciertas composiciones magnéticas provoca la co-agregación no específica de los glóbulos rojos después de la aplicación del campo magnético, lo que abole definitivamente la posibilidad de una lectura de una aglutinación específica de los glóbulos rojos en presencia del anticuerpo anti-antígeno eritrocitario, técnica de referencia en el campo de la transfusión sanguínea.

10 Así, queda poder disponer de un procedimiento rápido y se sencillo, que pueda ser realizado sobre un soporte práctico y disponible tal como una microplaca, procedimiento en el que la etapa de centrifugación está sustituida por la aplicación de un campo magnético, que puede ser totalmente automatizado y que permite realizar el fenotipaje de glóbulos rojos por lectura de aglutinación específica mediante anticuerpos de ensayo (suero de ensayo) aglutinantes sin interferir significativamente sobre la imagen final obtenida, pudiendo este procedimiento ser igualmente aplicable para la prueba de Simonin (contraprueba) en el ámbito del fenotipaje ABO. Tal procedimiento sería aún más ventajoso si la composición magnética utilizada no provocara agregación no específica de los glóbulos rojos uniéndose con ellos después de la aplicación del campo magnético y, llegado el caso, evitando la saturación de los sitios antigénicos de estos glóbulos rojos. Este procedimiento sería aún más ventajoso si la composición magnética utilizada permitiera asimismo en su presencia realizar una técnica de inmunoadherencia de glóbulos rojos sobre fase sólida, en particular para la RAI y/o para la prueba de compatibilidad, o también para el fenotipaje que necesita la utilización de sueros de ensayo no-aglutinantes, sin que esta composición magnética interfiera significativamente sobre la imagen de la reacción final obtenida con este tipo de técnica.

20 Este es justamente el objeto de la presente invención.

25 Los inventores han puesto en evidencia que unos eritrocitos puestos en contacto con una disolución diluida y acuosa de ferrofluido libre de agente tensioactivo, obtenido a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y de por lo menos un metal M(II) de grado II de oxidación (tal como Fe(II)), ferrofluido, tal como se obtiene en particular mediante los procedimientos descritos en los ejemplos 1 a 8 de la solicitud de patente francesa publicada bajo el nº 2 461 521 o en los ejemplos siguientes, estos, y contrariamente al procedimiento descrito en el documento de patente EP 0 230 768, en ausencia de adición de compuesto, que permite unir no específicamente las partículas magnéticas del ferrofluido a los eritrocitos, eran no sólo arrastrados con las partículas de ferrofluido en el fondo del contenedor que los contiene bajo la acción de un campo magnético inducido por un imán situado en el exterior y bajo dicho contenedor, sino que además este arrastre provocaba simultáneamente la aglutinación específica de estos eritrocitos cuando estos eritrocitos estaban también en contacto con un anticuerpo anti-antígeno de grupo sanguíneo aglutinante, de tipo IgM, dirigido contra un antígeno transportado por estos eritrocitos.

35 Los inventores han puesto en evidencia también, y de manera inesperada, que la presencia de las partículas magnéticas contenidas en la solución así diluida de ferrofluido, no interfería de manera significativa sobre esta aglutinación específica, pudiendo esta última ser puesta en evidencia a simple vista o mediante cualquier sistema de lectura automatizado adecuado capaz de detectar la presencia o la ausencia de aglutinados eritrocitarios.

40 Los inventores han puesto en evidencia también, de manera sorprendente, que tal solución de ferrofluido no interfería tampoco de manera significativa sobre la capacidad de los eritrocitos para fijarse sobre una fase sólida revestida de un ligando capaz de reconocer específicamente un compuesto fijado a la superficie de estos eritrocitos cuando estos últimos están en presencia de las partículas magnéticas contenidas en este ferrofluido (técnica de inmunoadherencia en fase sólida).

45 Así, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de fenotipaje de grupo sanguíneo, que puede incluir la prueba denominada de Simonin, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- 50 a) la mezcla de una suspensión de eritrocitos contenidos en la muestra con una solución acuosa de ferrofluido, siendo dicho ferrofluido obtenido o susceptible de ser obtenido a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y de por lo menos un metal M(II) de grado II de oxidación, a fin de obtener una suspensión homogénea de dichos eritrocitos en la solución de ferrofluido,
- 55 b) la puesta en contacto en un contenedor de la suspensión de eritrocitos obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo conocido, estando esta etapa seguida de una etapa de incubación;
- 60 c) la agitación de la suspensión obtenida en la etapa b) después de la incubación;
- d) la aplicación de un campo magnético a dicho contenedor, de tal manera que las partículas de ferrofluido sean arrastradas al fondo de dicho contenedor;
- 65 e) la agitación de la suspensión obtenida en la etapa d);
- f) la lectura a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura apropiado de la presencia eventual de

aglutinados eritrocitarios en el contenedor.

Dicho ferrofluido es tal como se obtiene en particular mediante los procedimientos descritos en los ejemplos 1 a 8 de la solicitud de patente francesa publicada bajo el nº 2 461 521 o en los ejemplos siguientes.

En la presente descripción, los términos eritrocitos, glóbulo rojo y hematíe se utilizarán indiferentemente para designar la misma célula sanguínea.

Preferentemente, la solución de ferrofluido que se utilizará en los procedimientos de la invención resultará de la dilución también en medio acuoso y preferentemente también en ausencia de tensioactivo (o detergente) para evitar en particular la lisis de los eritrocitos cuando estos últimos sean puestos en contacto con esta solución de ferrofluido.

Por solución diluida en medio acuoso sin agente tensioactivo de ferrofluido en solución acuosa sin agente tensioactivo, se entiende querer precisar aquí que el ferrofluido directamente obtenido o susceptible de ser directamente obtenido por los procedimientos de preparación de ferrofluido descritos en los ejemplos 1 a 8 de la solicitud de patente francesa publicada bajo el nº 2 461 521 o en los ejemplos siguientes, es una solución acuosa que no comprende agente tensioactivo y que la solución utilizada después de la obtención de este ferrofluido por dichos procedimientos con el objetivo de diluir este ferrofluido antes de la utilización en los procedimientos de la presente invención es una solución también acuosa que no comprende agente tensioactivo.

En un modo de realización preferido, dicha solución de ferrofluido se caracterizará porque está preparada a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y de por lo menos un metal M(II) de grado II de oxidación, preferentemente seleccionado de entre los metales de la primera serie de los metales de transición tales como Fe(II), Co(II), Mn(II), Cu(II) o Ni(II).

Preferentemente, dicha solución de ferrofluido está caracterizada porque se prepara a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y de por lo menos un metal M(II) asociado a un catión, tal como H^+ , CH_3^+ , $N(CH_3)_4^+$, $N(C_2H_5)_4^+$ o cualquier otro catión capaz de conferir al polioxoanión una mayor solubilidad en agua que los cationes Na, N^+ y NH_4^+ , estos cationes podrán ser aportados en particular por los ácidos apropiados, tales como HCl, CH_3COOH o también por el hidróxido de tetrametil- o tetraetil-amonio.

Preferentemente, dicha solución de ferrofluido está caracterizada porque las fuentes de metales de partida seleccionadas para Fe(III) y M(II) para preparar dicho ferrofluido serán unas sales seleccionadas entre:

- para Fe(III), las listadas en la solicitud de patente francesa publicada bajo el nº 2 461 521, página 4, línea 1 y 2, en particular el cloruro férrico, y
- para M(II), las listadas en la solicitud de patente francesa publicada bajo el nº 2 461 521, página 4, líneas 3 a 6, en particular el cloruro ferroso.

Preferentemente, dicha solución de ferrofluido se prepara a partir de una mezcla entre Fe(III) y el metal M(II), caracterizado porque la relación molar inicial de grado II es de 2 ± 1 ; de manera más preferida de $2 \pm 0,5$; $2 \pm 0,25$ o también $2 \pm 0,1$, siendo más preferida una relación molar inicial de 2 entre Fe(III) y el metal M(II) de grado II.

A la mezcla inicial de sal de Fe(III) y del metal M(II) de grado II se podrá añadir una base fuerte apropiada tal como el hidróxido de sodio, el hidróxido de tetrametil- o tetraetil-amonio.

Preferentemente, el procedimiento según la invención se caracteriza porque dicho ferrofluido se obtiene mediante los procedimientos descritos en los ejemplos 1 a 8, de la solicitud de patente francesa publicada bajo el nº 2 461 521 o aquellos tales como se describen a continuación en los ejemplos.

Más preferentemente, el procedimiento según la invención se caracteriza porque dicha solución acuosa de ferrofluido está previamente diluida en un tampón o en una solución fisiológica.

En ciertas aplicaciones, en particular cuando se trata de mejorar la sensibilidad o la velocidad de reacción (sin por ello aumentar la no especificidad del ensayo), se podrá utilizar un tampón denominado de baja fuerza iónica (BFI), denominado también tampón LISS ("LISS" por "Low Ionic Strength Solution").

Por tampón o solución fisiológica, el experto en la técnica entenderá que se trata en este caso de tampón habitualmente utilizado en el campo de la biología celular, en particular en inmunohematología a fin de evitar la lisis de los glóbulos rojos. Tales tampones o soluciones serán, por ejemplo, unos tampones con pH fisiológico, comprendido entre 6,7 y 7,5, con una molaridad ajustada, de tal manera que se parezca a la molaridad de una solución de tipo NaCl a 9 por mil (próximo a 0,15 M de NaCl). Se puede citar en particular, pero sin limitarse a, el tampón fosfato de tipo PBS a pH7 - 7,4 bien conocido por el experto en la técnica.

La composición de los tampones BFI o LISS no se desarrollará aquí, siendo estos tampones bien conocidos en

inmunoematología para favorecer las reacciones de aglutinación. Estos tampones están disponibles en particular de los fabricantes de reactivos para la inmunoematología (se podrá citar por ejemplo, pero sin limitarse a, el tampón de LISS de composición siguiente: 16 g/l de glicina, 0,03 M de NaCl y 0,015 M de fosfato a pH 6,7).

5 En un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención se caracteriza porque dicha solución de ferrofluido está diluida del 0,25 al 10% (v/v) en dicho tampón, o dicha solución fisiológica, preferentemente entre el 0,25 y el 5%, entre el 0,25 y el 2,5%, entre el 0,25% y el 1%, entre el 0,25 y el 0,75%.

10 Las diluciones comprendidas entre el 0,25% y el 1%, en particular el 0,5%, son particularmente preferidas para el fenotipaje mediante un procedimiento de aglutinación. Se puede señalar asimismo que para la prueba de compatibilidad (determinación de la compatibilidad directa entre el suero del receptor y el glóbulo rojo del donante, véase anteriormente), también pueden ser utilizadas unas diluciones superiores al 1% o comprendidas entre el 2% y el 10%.

15 Para el procedimiento según la invención para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo o de un anticuerpo anti-antígeno de grupo sanguíneo, se prefiere también que el contenedor de reacción sea una cúpula de microplaca, preferentemente una cúpula de fondo hemisférico ("fondo redondo") o de fondo en V.

20 En el procedimiento según la invención, la aplicación del campo magnético será preferentemente obtenida por un imán, de tipo permanente, situado en el exterior y por debajo del o de los contenedores de reacción, siendo dicho imán preferentemente de magnitud comprendida entre 8000 y 16000 gauss, preferentemente entre 10000 y 14000 gauss, siendo 12000 gauss la magnitud preferida.

25 Por procedimiento de determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo en la superficie de un eritrocito de una muestra, se entiende designar aquí, de manera particular, un procedimiento de fenotipaje eritrocitario (o también denominado aquí fenotipaje sanguíneo o de glóbulos rojos), que corresponde a la búsqueda y a la identificación de los antígenos de grupo sanguíneo en la superficie de los hematíes (con la excepción del sistema particular ABO, en el que se busca además la presencia de los anticuerpos regulares correspondientes (prueba denominada de Simonin)), refiriéndose esto tanto al receptor como al donante.

30 En la presente descripción, se entiende designar por un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo conocido, unos anticuerpos policlonales, monoclonales o también recombinantes de especificidad conocida capaz de reconocer y fijarse sobre el eritrocito que lleva el antígeno contra el cual está dirigido.

35 Estos anticuerpos de ensayo anti-antígenos de grupo sanguíneo conocido podrá presentarse en forma líquida en disolución o en forma desecada en el contenedor que sirve de soporte para la reacción de aglutinación o, llegado el caso, en el soporte que sirve a la puesta en contacto de los eritrocitos a fenotipar con dicho anticuerpo.

40 Más preferentemente, estos anticuerpos serán de tipo aglutinante, tales como unas IgM, en los procedimientos de la invención, por reacción de aglutinación, es decir capaces de aglutinar una suspensión de eritrocitos que transporta el antígeno de grupo contra el cual está dirigida la especificidad de dicho anticuerpo, esto sin la ayuda de una anti-inmunoglobulina y en las condiciones apropiadas bien conocidas por el experto en la técnica o indicadas en la ficha técnica del fabricante relacionada con la utilización de tal anticuerpo (tal como, por ejemplo, en medio salino a temperatura ambiente o también a 37°C, etc.).

45 En los procedimientos de fenotipaje según la invención en los que se preferirá o necesitará realizar, para ciertos antígenos de grupo sanguíneo, el fenotipaje según la invención mediante una técnica de tipo inmunoadherencia sobre fase sólida, en particular:

- 50
- cuando dicho fenotipaje sea realizado con la ayuda de un contenedor para la reacción final cuya pared interna inferior sea previamente revestida de una anti-inmunoglobulina o de cualquier ligando capaz de reconocer específicamente y fijar el complejo específico anticuerpo de ensayo/eritrocito; o
 - 55 - cuando dicho fenotipaje sea realizado con la ayuda de un contenedor para la reacción final cuya pared interna inferior sea previamente revestida de dicho anticuerpo de ensayo, capaz de reconocer específicamente y fijar el eritrocito que transporta el antígeno que corresponde al anticuerpo de ensayo,

60 dichos anticuerpos de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo conocido podrá ser de naturaleza no aglutinante, tales como unas IgG o uno de sus fragmentos capaz de reconocer dicho antígeno.

65 En un procedimiento particular, la mezcla en la etapa a) de dicho procedimiento podrá ser realizada previamente al ensayo, 1 hora, incluso varias horas, un día o varios días antes o, llegado el caso, podrá ser obtenido del fabricante, y esto cuando se trate de mezclar una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo conocido con una solución de ferrofluido. Será el mismo el caso para todos los procedimientos.

5 En este procedimiento, para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, dicha solución de ferrofluido utilizada en la etapa a) es una solución diluida de ferrofluido directamente obtenido o susceptible de ser directamente obtenido por los procedimientos de preparación de ferrofluido descritos en los ejemplos 1 a 8 de la solicitud de patente francesa publicada bajo el nº 2 461 521 o en los ejemplos siguientes.

10 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere que antes de la etapa b) dicha suspensión de eritrocitos contenidos en la muestra esté previamente sometida a la acción de una enzima proteásica.

15 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que cuando la suspensión obtenida en la etapa a) es una suspensión de eritrocitos procedente de la muestra, dicha suspensión de eritrocitos esté sometida a la acción de la enzima proteásica al final de la etapa a).

20 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que en la etapa b) los anticuerpos de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo estén contenidos en forma desecada en el contenedor antes de la puesta en contacto de la suspensión obtenida en la etapa a) si esta suspensión es una suspensión de eritrocitos procedentes de la muestra.

25 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que los anticuerpos de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo conocido sean unos anticuerpos aglutinantes, preferentemente de tipo IgM.

30 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que la etapa de incubación al final de la etapa b) se efectúe durante un tiempo comprendido entre 5 y 15 minutos, preferentemente 10 minutos a temperatura ambiente.

35 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que la etapa c) de agitación se efectúe durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 2 minutos 30 segundos, preferentemente durante 1 minuto a 2 minutos.

40 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que la etapa d) de aplicación de un campo magnético a dicho contenedor se realice mediante un imán situado en el exterior, bajo el contenedor, de tal manera que las partículas de ferrofluido sean arrastradas al fondo de dicho contenedor según un eje vertical.

45 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que en la etapa d), dicho imán sea un imán permanente de magnitud comprendida entre 10000 y 14000 gauss, preferentemente 12000 gauss.

50 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que en la etapa d) el campo magnético se aplique durante 2,5 minutos a 10 minutos, preferentemente durante 4 minutos a 6 minutos a dicho contenedor.

55 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que en la etapa e), la agitación de la suspensión antes de la lectura se efectúe en dos etapas de agitación sucesivas, siendo la segunda menos larga y menos vigorosa que la primera.

60 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que en la etapa a), dicha suspensión de eritrocitos procedentes de eritrocitos contenidos en la muestra proceda de un residuo de eritrocitos obtenido después de la sedimentación o centrifugación, preferentemente por sedimentación, de una muestra de sangre total de un individuo.

65 En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que en la etapa b), dicho contenedor sea una cúpula de microplaca, preferentemente una cúpula de fondo hemisférico ("fondo redondo").

En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que en la etapa c) la agitación se efectúe con la ayuda de un agitador para microplaca a una velocidad comprendida entre 500 y 800 rpm, preferentemente entre 650 y 750 rpm.

En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que en la etapa e), la agitación se efectúe en 2 etapas con la ayuda de un agitador para microplaca, una primera de agitación durante 1 a 2 minutos 30 segundos, a una velocidad de 800 y 1000 rpm, preferentemente 1 minuto 4 segundos a una velocidad de 900 rpm, y una segunda agitación durante 30 segundos a 1 minuto a una velocidad comprendida entre 350 y 550 rpm, preferentemente 45 segundos a una velocidad de 450 rpm.

En este procedimiento para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo según la invención, se prefiere también que en la etapa b):

- se pongan en contacto en dicha cúpula de 40 μ l a 50 μ l de la suspensión de eritrocitos obtenida en la etapa a) con los anticuerpos de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo conocido contenidos en forma desecada en el fondo de la cúpula, si la suspensión de eritrocitos obtenida en la etapa a) es una suspensión de eritrocitos procedente de la muestra; y, llegado el caso
- se pongan en contacto en dicha cúpula de 20 μ l a 30 μ l de la suspensión de eritrocitos obtenida en la etapa a) con 20 μ l a 30 μ l de plasma o de suero de la muestra susceptible de contener los anticuerpos anti-antígeno de grupo sanguíneo, si la suspensión de eritrocitos obtenida en la etapa a) es una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo sanguíneo conocido.

En un modo particular de realización, la presente invención tiene por objeto un procedimiento según la invención para el grupo sanguíneo ABO de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque en la etapa b):

- se pone en contacto en tantos contenedores distintos la suspensión de eritrocitos procedentes de la muestra obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo anti-A y un anticuerpo de ensayo anti-B; y
- se pone en contacto en distintos contenedores una muestra de plasma o de suero del individuo con una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A, preferentemente A1, una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo B y, llegado el caso, una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo O,

caracterizado porque en la etapa f) se evalúa por lectura a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura apropiado, la presencia eventual de aglutinados eritrocitarios en cada uno de dichos contenedores, permitiendo el conjunto de estas lecturas determinar el grupo ABO del individuo.

En un modo asimismo particular de realización, la presente invención tiene por objeto un procedimiento según la invención para el fenotipaje sanguíneo, fuera de la prueba de Simonin, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque en la etapa b):

- se ponen en contacto en distintos contenedores la suspensión de eritrocitos procedentes de la muestra obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo del cual se busca determinar la presencia o la ausencia sobre los eritrocitos de la muestra, conteniendo cada contenedor una sola especificidad de anticuerpos,

caracterizado porque en la etapa f) se evalúa por lectura a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura apropiado, la presencia eventual de aglutinados eritrocitarios en cada uno de dichos contenedores, permitiendo el conjunto de estas lecturas determinar el fenotipo del individuo para los antígenos de grupo sanguíneo buscados.

En un modo asimismo particular de realización, la presente invención tiene por objeto un procedimiento según la invención, para el fenotipaje sanguíneo, prueba de Simonin incluida, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque en la etapa b):

- se ponen en contacto en distintos contenedores la suspensión de eritrocitos procedente de la muestra obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo anti-A y un anticuerpo de ensayo anti-B; y
- se ponen en contacto en otros tantos contenedores distintos la suspensión de eritrocitos procedente de la muestra obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo, fuera del antígeno A y B, del cual se busca determinar la presencia o la ausencia sobre los eritrocitos de la muestra, conteniendo cualquier otro contenedor una sola especificidad de anticuerpo; y
- se ponen en contacto en distintos contenedores una muestra de plasma o de suero del individuo con una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A, una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo B y, llegado el caso, una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo O,

caracterizado porque en la etapa f) se evalúa mediante lectura a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura apropiado, la presencia eventual de aglutinados eritrocitarios en cada uno de dichos contenedores, permitiendo el conjunto de estas lecturas determinar el grupo ABO del individuo y determinar el fenotipo del individuo para los otros antígenos de grupo sanguíneo buscados.

5 Se describe asimismo un procedimiento para la búsqueda y/o la identificación de anticuerpos irregulares en una muestra de plasma o de suero de un receptor, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- 10 a) la incubación de un primer contenedor de dicha muestra de plasma o de suero con una suspensión de eritrocitos de ensayo de fenotipo conocido en condiciones que permiten a los anticuerpos irregulares susceptibles de estar presentes, fijarse específicamente sobre los eritrocitos de ensayo;
- 15 b) la adición de una solución de ferrofluido a la mezcla obtenida en la etapa a), a fin de obtener una suspensión homogénea de dichos eritrocitos en la solución de ferrofluido;
- 20 c) la aplicación de un campo magnético a dicho contenedor mediante un imán situado en el exterior y debajo de dicho contenedor a fin de arrastrar dichos eritrocitos con las partículas magnéticas contenidas en el ferrofluido en el fondo de dicho contenedor (prensado de los eritrocitos), seguida, llevado el caso, de una eliminación del sobrenadante obtenido;
- 25 d) llegado el caso, el lavado del residuo de eritrocitos y de partículas magnéticas por adición de una solución de lavado, seguido de la eliminación del sobrenadante después del prensado de los eritrocitos, pudiendo esta etapa ser realizadas varias veces;
- 30 e) la transferencia en un segundo contenedor de una muestra o de la totalidad de la suspensión de eritrocitos y de ferrofluido obtenida en la etapa c) o d), estando dicho contenedor revestido sobre su pared interna inferior de una anti-globulina capaz de reconocer y fijar sobre esta pared los complejos anticuerpos irregulares/eritrocitos de ensayo eventualmente presentes;
- 35 f) la aplicación de un campo magnético a dicho segundo contenedor, de tal manera que los eritrocitos sean arrastrados en el fondo de dicho contenedor con las partículas magnéticas contenidas en el ferrofluido; y
- g) la lectura a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura apropiado de la distribución de los eritrocitos sobre la pared inferior del contenedor.

En este procedimiento, la presencia de un solo punto rojo situado en el eje vertical del contenedor y en su fondo podrá ser interpretada como una ausencia de anticuerpos irregulares;

40 Sin embargo, la presencia significativa de eritrocitos repartidos sobre toda la parte del contenedor revestido de anti-inmunoglobulina (o de anti-especie, véase la variante a continuación) podrá ser interpretada como una presencia de anticuerpos irregulares.

45 Se describe asimismo un procedimiento para la búsqueda y/o la identificación de anticuerpos irregulares según la presente invención, caracterizado porque la etapa b) de adición de una solución de ferrofluido a la suspensión de dichos eritrocitos de ensayo se efectúa previamente antes de la adición de dicha muestra de suero o de plasma.

Un procedimiento para la búsqueda y/o la identificación de anticuerpos irregulares puede comprender las etapas siguientes:

- 50 - antes de la etapa e), se pone en contacto en el primer contenedor la suspensión de eritrocitos lavada obtenida en la etapa anterior con una solución de anti-inmunoglobulina y, llegado el caso, después de la agitación y de la incubación;
- 55 - se transfiere en el segundo contenedor una muestra o la totalidad de la suspensión de eritrocitos y de ferrofluido obtenida, estando dicho segundo contenedor revestido en su pared interna inferior de una anti-globulina, preferentemente un anticuerpo anti-especie, capaz de reconocer y fijar sobre esta pared los complejos anti-inmunoglobulina/anticuerpos irregulares/eritrocitos de ensayo eventualmente presentes.

60 Se describe asimismo un procedimiento para determinar la compatibilidad entre un concentrado eritrocitario de un donante y un receptor, caracterizado porque comprende las etapas del procedimiento para la búsqueda y/o la identificación de anticuerpos irregulares tales como se han descrito anteriormente, pero en el que en la etapa a),

65 se incuba en dicho primer contenedor una muestra de plasma o de suero del receptor con una suspensión de eritrocitos del donante en condiciones que permiten a los anticuerpos susceptibles de estar presentes y dirigidos contra un antígeno de grupo sanguíneo presente sobre los eritrocitos del donante, fijarse sobre dichos eritrocitos,

siendo las etapas siguientes y sus variantes idénticas al procedimiento para la RAI descrito anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno del grupo sanguíneo en la superficie de un eritrocito de una muestra, caracterizado porque comprende:

- a) un contenedor que contiene una solución de ferrofluido;
- b) un contenedor que contiene la suspensión de eritrocitos de la muestra que se debe ensayar;
- c) uno o varios contenedores de reacción que contienen un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo. Este anticuerpo puede estar en forma desecada.

El dispositivo puede contener uno o varios contenedores que contienen una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo conocido;

- d) por lo menos un imán o un conjunto de imanes que pueden estar dispuestos en el exterior de dicho o de dichos contenedores y debajo de dicho o dichos contenedores;
- e) un sistema de agitación de dicho o dichos contenedores.

El dispositivo puede también comprender un lector capaz de evaluar la presencia de aglutinados eritocitarios en cada uno de los contenedores.

Preferentemente, el dispositivo según la invención está caracterizado porque dicho contenedor de reacción es una cúpula de microplaca, pudiendo esta última ser de fondo hemisférico.

En un modo particular de realización, la invención tiene por objeto un dispositivo para el grupo sanguíneo ABO de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque:

- dichos contenedores que contienen una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo conocido contienen distintamente una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A, una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo B. Pudiendo dichos contenedores contener una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo O.
- dichos contenedores que contienen un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo contienen distintamente un anticuerpo anti-A y un anticuerpo anti-B.

En un modo también particular de realización, la invención tiene por objeto un dispositivo para el fenotipaje sanguíneo, fuera de la prueba de Simonin, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque:

- dichos contenedores contienen distintamente un anticuerpo de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo del cual se busca determinar la presencia o la ausencia en los eritrocitos de la muestra.

En un modo también particular de realización, la invención tiene por objeto un dispositivo para el fenotipaje sanguíneo, prueba de Simonin incluida, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque:

- dichos contenedores, que contienen una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo conocido, contienen distintamente una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A, una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo B, y se puede añadir una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo O;
- dichos contenedores, que contienen un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo, contienen distintamente un anticuerpo anti-A, un anticuerpo anti-B y un anticuerpo de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo, fuera de ABO, del cual se busca determinar la presencia o la ausencia en los eritrocitos de la muestra.

En otro aspecto, la presente invención tiene por objeto un kit o un neceser de reactivos para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno del grupo sanguíneo en la superficie de un eritrocito de una muestra, caracterizado porque comprende:

- a) uno o varios contenedores de reacción que contienen distintamente un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo;
- b) una solución de ferrofluido. El ferrofluido puede estar diluido en un tampón o en una solución fisiológica, por ejemplo en un tampón de baja fuerza iónica;

Puede ser añadida una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo sanguíneo conocido.

e) uno o varios imanes pueden estar dispuestos en el exterior debajo del o de los contenedores de reacción.

La invención se refiere particularmente a un kit o a un neceser de reactivos según la invención, para el grupo sanguíneo ABO de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque:

- dichos contenedores, que contienen una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo conocido, contienen distintamente una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A, una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo B. Se puede añadir una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo O.

- dichos contenedores, que contienen un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo, contienen distintamente un anticuerpo anti-A y un anticuerpo anti-B.

La invención se refiere asimismo a un kit o neceser de reactivos según la invención, para el fenotipaje sanguíneo, prueba de Simonin incluida, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque comprende además por lo menos tantos contenedores que contienen distintamente anticuerpos de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo, diferente del antígeno A y B, del cual se busca determinar la presencia o la ausencia sobre los eritrocitos de la muestra a fenotipar.

Preferentemente, el kit o neceser de reactivos según la invención se caracteriza porque dichos anticuerpos de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo contenidos en dichos contenedores están en forma desecada.

Más preferentemente, el kit o neceser de reactivos según la invención se caracteriza porque dichos contenedores son unas cúpulas de microplacas. Pudiendo ser estas cúpulas de fondo hemisférico.

Los ejemplos siguientes están destinados a ilustrar la invención sin limitar de ninguna manera el alcance.

Ejemplo 1: Fabricación del ferrofluido prepurificado

Material y método

Fabricación del ferrofluido:

Material particular y productos

- 1 filtro Stericup GS 200 ml 0,22 μm (Ref.: 107943)
- 1 imán
- solución de NH_4OH al 28-30% (ACROS, Ref.: 205840025 lote n° A 017559001)
- solución HNO_3 al 60% (NORMAPUR, Ref.: UN 2031 lote n° NI82)
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA, Ref.: 22,029-9 lote n° S18641-463)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA, Ref.: F-2877, lote n° 033K0108)

Fabricación del ferrofluido:

- 1/ Pesar 13,51 g de FeCl_3 y disolver en 20 ml de agua desmineralizada y filtrada por agitación magnética. Transferir la solución en una probeta de 50 ml, aclarar y completar con 50 ml de agua desmineralizada filtrada (solución a 1M).
- 2/ Pesar 19,88 g de FeCl_2 y disolver en 20 ml de agua desmineralizada y filtrada por agitación magnética. Transferir la solución en una probeta de 50 ml, aclarar y completar con 50 ml de agua desmineralizada filtrada (solución a 2M).
- 3/ Filtrar cada solución sobre filtro jeringa 0,22 μm .
- 4/ Poner 30 ml de una solución de amoníaco (NH_4OH) al 28% en una probeta de 250 ml y añadir csp 120 ml de agua desmineralizada y filtrada (solución a 2M).
- 5/ Pesar el matraz de vidrio de 1l del Rotovapor al vacío.

Incubación:

- 6/ Poner 10 ml de la solución de FeCl_2 (2M) y 40 ml de la solución de FeCl_3 (1M) en el matraz de 1l para Rotovapor, homogeneizar la solución agitando el matraz con la mano.

ES 2 435 072 T3

- 7/ Añadir 200 ml de agua desmineralizada filtrada, homogeneizar la solución agitando el matraz con la mano.
- 8/ Colocar el matraz de manera inclinada sobre un aparato de tipo Rotovapor.
- 5 9/ Hacer girar el matraz a velocidad máxima para homogeneizar bien la solución.
- 10/ Añadir 120 ml de la solución de amoníaco 2M.
- 11/ Dejar girar el matraz durante 15 minutos.
- 10 12/ Poner 105 ml de ácido nítrico (HNO_3) al 60% en un frasco de 1l y añadir csp 1l de agua desmineralizada filtrada (solución a 1M).
- 13/ Después de los 15 minutos de rotación, colocar el matraz sobre el imán durante 4 minutos.
- 15 14/ Aspirar la totalidad del sobrenadante.
- 15/ Resuspender el residuo.
- 20 1^{er} lavado:
- 16/ Colocar el matraz sobre el Rotovapor y hacerlo girar a velocidad máxima.
- 17/ Añadir 200 ml de solución de HNO_3 a 1M.
- 25 18/ Dejar girar el matraz durante 10 minutos.
- 19/ Resuspender el residuo.
- 30 20/ Repetir la operación hasta la disolución completa del residuo.
- 21/ Colocar el matraz encima para hacer decantar la suspensión de hierro.
- 22/ Aspirar el sobrenadante.
- 35 23/ Resuspender el residuo.
- Las etapas 16 a 23 pueden ser repetidas si es necesario.
- 40 Dilución final:
- 26/ Pesar el matraz.
- 27/ Deducir la masa del residuo obtenido y calcular el rendimiento de la reacción: (masa del residuo
45 obtenido/masa del hierro inicial) x 100
- Masa de hierro inicial) 14,77 g
- 55% < rendimiento
- 50 28/ Añadir 200 ml de agua filtrada en el matraz,
- 29/ Colocar el matraz sobre el Rotovapor.
- 55 30/ Resuspender el residuo.
- 31/ Filtrar la solución sobre un filtro Stericup a 0,22 μm .
- 60 Preparación de la solución madre de ferrofluido
- Diluir el ferrofluido así obtenido en un tampón LISS o una disolución fisiológica a la concentración deseada en un frasco. Anotar sobre una etiqueta pegada sobre el frasco la concentración de ferrofluido, el número de lote de ferrofluido y la fecha de fabricación.
- 65 Conservación del ferrofluido y/o de la solución diluida a 4°C.

Ejemplo 2: Fenotipaje de 288 muestras: 144 donantes + 144 receptores por técnica automatizada (sobre un autómatas de tipo TECAN).

5 Autómata TECAN equipado de una placa de 96 imanes de isopolos alternos en norte-sur (12000 Gauss), de un Téléshake Variomag H+P Lab y de un lector de microplaca.

Extracción sanguínea sobre anticoagulante de tipo EDTA

10 puesta en contacto extemporánea de los glóbulos rojos (GR) de pacientes con diferentes lotes de ferrofluido diluido entre 0,3 y 0,5% (v/v) en LISS o en un tampón fisiológico.

Contraprueba: hematíes A1 y B de un panel puesto en contacto extemporáneamente con diferentes lotes de ferrofluido diluido entre 0,3 y 0,5 (v/v) en LISS o en un tampón fisiológico, y conservadas a 4°C al 1% de GR (v/v).

15 Imantación de 5 minutos.

Agitaciones sobre Téléshake.

20 Antes de la imantación: 1 minuto 30 segundos, a 700 rpm nwse.

Después de la imantación: 2 minutos a 900 rpm nswe + 45 segundos a 450 rpm nswe.

Resultados:

25 El rendimiento del ensayo se ha evaluado en comparación con una técnica de referencia seleccionada: denominada DUO MICRO en técnica manual.

Utilización de 4 lotes de ferrofluido diluidos entre 0,34 y 0,45% (v/v) en LISS o en un tampón fisiológico preparado como anteriormente, de manera aleatoria sobre las 288 muestras.

30 Concordancia con la técnica de referencia superior o igual al 98% (6 rechazos).

21 Kell positivos esperados ⇒ 20 Kell positivos encontrados.

35 Ningún punto de sedimentación.

Tabla comparativa de las dos técnicas:

		Técnica con ferrofluido			
		+	-	dudoso	
Duo-Micro	+	282	0	0	282
	-	0	0	4 (TN ; D)	4
	Dudoso	0	1 (K en DP)	1 (C en DP)	2
		282	1	5	288

40 Identificación de los rechazos observados:

Una muestra con el rh1 dudoso (valor lector = 33) y su TN granuloso (valor lector = 3).

Una muestra con Rh1 dudoso (valor lector = 28).

Una muestra con una Doble Población (DP) realizada en C, no detectada sobre el autómatas (valor lector = 6).

45 Una muestra con el Rh1 granuloso (valor lector = 15).

Una muestra con una Doble Población baja en Kell y no detectada sobre autómatas.

Una muestra con el TN que granula (valor lector = 17).

50 Se debe señalar que los tubos con las dobles poblaciones, contenían muy poco residuo globular, lo que puede inducir a unos problemas de extracción en el tubo por las agujas del TECAN.

Además, las dobles poblaciones han sido sólo muy débilmente detectadas por la técnica de referencia (Duo Micropar centrifugation) a simple vista y el lector los interpreta como dudosos.

55 Las granulaciones son sólo muy débilmente visibles a simple vista y si se levanta el límite de negatividad, ya no serán detectadas por el lector.

Ejemplo 3: Fenotipaje de muestras: técnica automatizada (sobre autómata de tipo TECAN)

Material:

- 5 Extracción de donantes y receptores sobre tubos EDTA (ácido etilendiamina tetraacético),
soluciones de ferrofluidos puros lavados,
- 10 puesta en contacto extemporánea de los glóbulos rojos (GR) de pacientes con diferentes lotes de ferrofluido diluidos
entre 0,3 y 0,5% (v/v) en LISS,
Hematíes de contraprueba, puesta en contacto extemporánea y conservados al 1%, preferentemente en un tampón
fisiológico, a 4°C,
- 15 Broméline Diagast código nº 69024,
Microplacas Duo Micro, lote 302000.
LISS Diagast, código V6901B-1.
- 20 Placa de 96 pocillos (Deep Well, 700 µl) Greiner.
Protocolo:
- 25 centrifugar los tubos de pacientes a 2500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente,
Colocar los tubos de muestras en los portadores,
Colocar los tubos de hematíes de ensayo (A1 y B) en suspensión en el ferrofluido para la contraprueba sobre un
30 portador,
Hacer una solución magnetizante de ferrofluido con una DO a 450 nm equivalente a 0,9 en LISS, a repartir en 8
tubos con hemólisis en posición nº 1 a 8 Grid nº 4.
- 35 Rellenar el Rack nº 2 de Broméline.
Colocar la placa Deep Well sobre el sitio nº 1 Grid nº 7 y las microplacas Du Micro sobre el sitio nº 2 y 3 Grid nº 7.
Hacer comenzar el protocolo Duo Micro por el TECAN:
- 40 depósito de 25 µl de plasma en los pocillos de contraprueba,
distribución, en la Depp Well, de 240 µl de solución magnetizante por muestra que se debe ensayar,
- 45 añadir 10 µl de residuo globular a la solución magnetizante,
homogeneización de la suspensión globular mediante varias aspiraciones-rechazos,
adición de 700 µl de bromelina,
- 50 depósito de 40 µl de suspensión globular magnetizada y bromelinada en los pocillos de las 2 microplacas Duo Micro,
depósito de 25 µl de hematíes de ensayo en los pocillos de la contraprueba,
- 55 incubación de unas microplacas durante 10 minutos,
agitación de la microplaca sobre el Teleshake a 700 rpm durante 1 minuto y 30 segundos,
imantación de unas microplacas durante 5 minutos,
- 60 agitación de la microplaca sobre Teleshake a 900 rpm durante 2 minutos, y después a 450 rpm durante 45
segundos,
Lectura de la placa sobre el lector, y después lectura a simple vista.

Ejemplo 4: fenotipaje de 312 muestras en técnica manual

Protocolo:

- 5 Fabricación del ferrofluido: véase el ejemplo 1
- Factibilidad manual realizada sobre 312 muestras: 160 donantes + 152 receptores
- 10 Extracciones sanguíneas sobre EDTA
- Magnetización extemporánea de GR de pacientes con diferentes lotes de solución madre de ferrofluido diluidos en LISS a fin de obtener una dilución final del ferrofluido entre 0,3% y 0,5%,
- 15 Contraprueba: hematíes A1 y B de un panel puestos en suspensión en un frasco de vidrio en la solución de ferrofluido diluido (solución madre diluida al 0,3% en LISS o en un tampón fisiológico) y conservadas a 4°C al 1% de GR (en LISS, preferentemente en un tampón fisiológico),
- Imantación de 5 minutos,
- 20 Agitaciones sobre Téléshake:
- Antes de la imantación: 1 minuto 30 segundos a 700 rpm nwse
- 25 Después de la imantación: 2 minutos a 900 rpm nwse + 45 segundos a 450 rpm nwse
- Resultados:
- El rendimiento del ensayo se evaluó en comparación con la técnica de referencia elegida: DUO MICRO en técnica manual.
- 30 Utilización de los 4 lotes de ferrofluido citados anteriormente de manera aleatoria sobre las 312 muestras.
- Concordancia con la técnica de referencia = 98%
- 35 Rechazo = 2% (7 muestras rechazadas/312)
- 35 Kell positivos esperados ⇒ 34 Kell positivos encontrados.
- 40 % de puntos de sedimentación = 0,4% (15 pocillos/3744)

Tabla comparativa de las 2 técnicas:

		Técnica "ferrofluido"			
		+	-	Dudoso (Dtx)	
Duo-Micro	+	305	0	0	305
	-	0	0	5 (TN = granulaciones)	5
	Dtx	0	1 (Kell en DP)	1 (C en DP)	2
		305	1	6	312

- 45 Identificación de los rechazos observados:
- Una muestra con una doble población (DP) baja en C, interpretada como dudosa (valor lector =33) pero también interpretada dudosa a simple vista y con el lector en la técnica de referencia (valor lector = 27).
- 50 Una muestra con una doble población en Kell y no detectada (FN). Se debe de señalar que la muestra presentaba muy poco volumen en el tubo, lo que hace la extracción del residuo muy difícil y puede conllevar una disminución de la hematocrito en esta etapa del protocolo.
- 55 5 muestras han presentado unas granulaciones en los TN (valores lector = 18, 14, 12, 36 y 18) así como en todas las especificidades para las cuales no eran negativos (los valores lector era < 20). Dos de estas muestras estaban en la misma placa.

Conclusión:

Al final de este estudio, se puede observar que los rendimientos de la técnica que utiliza el ferrofluido para el fenotipaje son muy próximos de los de la técnica de referencia utilizada en comparación.

5 Si la técnica "ferrofluido" no detectó algunas dobles poblaciones muy débiles, mientras que la técnica de referencia los detectaban como dudosos, se puede señalar sin embargo que estos 2 falsos negativos pueden explicarse por el hecho de que los tubos de muestras estaban muy poco llenos, y siendo el volumen del residuo globular bajo, el hematocrito de la muestra se vuelve demasiado bajo.

10 En general, y en el conjunto de la población de receptores ensayados, 30% son unas muestras que presentan dobles poblaciones que son siempre detectadas en la técnica "ferrofluido".

15 En lo que se refiere a las muestras rechazadas tras granulaciones, estas son poco visibles a simple vista, y el lector los rechaza ya que supera el límite de negatividad fijado en 10. Actualmente, este límite de negatividad está fijado en 15, incluso en 20 sobre todos los lectores. En el caso en el que se fijase el límite a estos mismos valores, el porcentaje de rechazo sería inferior al 1%.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de fenotipaje de grupo sanguíneo, en el que se determina por reacción de aglutinación de eritrocitos la presencia de un antígeno de grupo sanguíneo en la superficie de un eritrocito de una muestra, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- 10 a) la mezcla de una suspensión de eritrocitos contenidos en la muestra con una solución acuosa de ferrofluido obtenido o susceptible de ser obtenido a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y de por lo menos un metal M(II) de grado II de oxidación para obtener una suspensión homogénea de dichos eritrocitos en la solución de ferrofluido,
- 15 b) la puesta en contacto en un contenedor de la suspensión de eritrocitos obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo conocido, estando esta etapa seguida de una etapa de incubación;
- 20 c) la agitación de la suspensión obtenida en la etapa b) después de la incubación;
- d) la aplicación de un campo magnético a dicho contenedor, de tal manera que las partículas magnéticas contenidas en dicho ferrofluido sean arrastradas al fondo de dicho contenedor;
- e) la agitación de la suspensión obtenida en la etapa d);
- 25 f) la lectura a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura apropiado de la presencia eventual de aglutinados eritrocitarios en el contenedor.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha solución acuosa de ferrofluido es sin agente tensioactivo.
- 30 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque dicho ferrofluido es preparado a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y de por lo menos un metal M(II) de grado II de oxidación, preferentemente seleccionado de entre los metales de la primera serie de los metales de transición tales como Fe(II), Co(II), Mn(II), Cu(II) o Ni(II).
- 35 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho ferrofluido es preparado a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y Fe(II).
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicho ferrofluido es preparado a partir de una mezcla de polioxoaniones asociada a un catión.
- 40 6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho catión se selecciona de entre H^+ , CH_3^+ , $N(CH_3)_4^+$, $N(C_2H_5)_4^+$.
- 45 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque las fuentes de metales de partida seleccionadas para Fe(III) y M(II) para preparar dicho ferrofluido serán, respectivamente, el cloruro férrico y el cloruro ferroso.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque dicho ferrofluido es preparado a partir de una mezcla inicial Fe(III) y de metal M(II) de relación molar comprendida entre 1 y 3.
- 50 9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque dicho ferrofluido es preparado a partir de una mezcla inicial Fe(III) y de metal M(II) de relación molar igual a $2 \pm 0,1$.
10. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho ferrofluido es susceptible de ser obtenido mediante los procedimientos descritos en los ejemplos 1 a 8 de la solicitud de patente francesa publicada bajo el nº 2 461 521.
- 55 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dicha solución acuosa de ferrofluido está previamente diluida en un tampón o una solución fisiológica.
- 60 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dicha solución acuosa de ferrofluido está diluida del 0,25 al 10% (v/v) en dicho tampón o dicha solución fisiológica.
- 65 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 y 12, caracterizado porque dicho tampón es un tampón de baja fuerza iónica.

- 5 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque en la etapa a) dicha solución de ferrofluido es una solución de ferrofluido obtenido susceptible de ser obtenido a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y de por lo menos un metal M(II) de grado II de oxidación que se ha diluido previamente en un tampón o en una disolución fisiológica en un intervalo comprendido entre 0,2 y 2% (v/v).
- 10 15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque dicha solución de ferrofluido obtenido o susceptible de ser obtenido a partir de una mezcla de polioxoaniones de Fe(III) y de por lo menos un metal M(II) de grado II de oxidación se ha diluido previamente en un tampón o en una solución fisiológica en un intervalo comprendido entre 0,25 y 0,75% (v/v).
- 15 16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque antes de la etapa b), dicha suspensión de eritrocitos contenidos en la muestra se somete previamente a la acción de una enzima proteásica.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque dicha suspensión de eritrocitos está sometida a la acción de la enzima proteásica al final de la etapa a).
- 20 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque los anticuerpos de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo conocido son unos anticuerpos aglutinantes.
19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado porque la etapa de incubación al final de la etapa b) se efectúa durante un tiempo comprendido entre 5 y 15 minutos.
- 25 20. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque la etapa c) de agitación se efectúa durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 2 minutos 30 segundos.
- 30 21. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado porque la etapa d) de aplicación de un campo magnético de dicho contenedor se realiza mediante un imán situado en el exterior debajo de dicho contenedor, de tal manera que las partículas de ferrofluido sean arrastradas al fondo de dicho contenedor según un eje vertical.
- 35 22. Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado porque la etapa d) dicho imán es un imán permanente de magnitud comprendida entre 10 000 y 14 000 gauss.
23. Procedimiento según la reivindicación 21 o 22, caracterizado porque en la etapa d) el campo magnético es aplicado durante 2,5 minutos a 10 minutos en dicho contenedor.
- 40 24. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 23, caracterizado porque en la etapa e), la agitación de la suspensión antes de la lectura se efectúa en dos etapas de agitación sucesivas, siendo la segunda menos larga y menos vigorosa que la primera.
- 45 25. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado porque en la etapa a), dicha suspensión de eritrocitos procedente de eritrocitos contenidos en la muestra procede de un residuo de eritrocitos obtenido después de la sedimentación de una muestra de sangre total de un individuo.
- 50 26. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 25, caracterizado porque en la etapa b), dicho contenedor es una cúpula de microplaca.
27. Procedimiento según la reivindicación 26, caracterizado porque en la etapa c), la agitación se efectúa con la ayuda de un agitador para microplaca a una velocidad comprendida entre 500 y 800 rpm.
- 55 28. Procedimiento según la reivindicación 26 o 27, caracterizado porque en la etapa e), la agitación se efectúa en 2 etapas con la ayuda de un agitador para microplaca, una primera agitación durante 1 a 2 minutos 30 segundos comprendida entre 800 y 1000 rpm, y una segunda agitación durante 30 segundos a 1 minuto a una velocidad comprendida entre 350 y 550 rpm.
- 60 29. Procedimiento según una de las reivindicaciones 26 a 28, caracterizado porque en la etapa b):
- se pone en contacto en dicha cúpula de 40 µl a 50 µl de la suspensión de eritrocitos obtenida en la etapa a) con unos anticuerpos de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo conocido contenidos en forma desecada en el fondo de la cúpula.
- 65 30. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 29, para el grupo sanguíneo ABO de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque en la etapa b):
- se pone en contacto en distintos contenedores la suspensión de eritrocitos procedentes de la muestra obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo anti-A y un anticuerpo de ensayo anti-B; y

- se pone en contacto en distintos contenedores distintos la suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A y de grupo B obtenida en la etapa a) después de la mezcla de una suspensión de eritrocitos de ensayo con una solución acuosa de ferrofluido, con una muestra de plasma o de suero del individuo,

5 caracterizado porque en la etapa f) se evalúa mediante lectura a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura apropiado, la presencia eventual de aglutinados eritrocitarios en cada uno de dichos contenedores, permitiendo el conjunto de estas lecturas determinar el grupo ABO del individuo.

10 31. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 29, para el fenotipaje sanguíneo, fuera de la prueba de Simonin, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque en la etapa b):

- se ponen en contacto en distintos contenedores la suspensión de eritrocitos procedentes de la muestra obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo, del cual se busca determinar la presencia o la ausencia sobre los eritrocitos de la muestra, conteniendo cada contenedor una sola especificidad de anticuerpos,

15 caracterizado porque en la etapa f) se evalúa por lectura a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura apropiado, la presencia eventual de aglutinados eritrocitarios en cada uno de dichos contenedores, permitiendo el conjunto de estas lecturas determinar el fenotipo del individuo para los antígenos de grupo sanguíneo buscados.

20 32. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 30, para el fenotipaje sanguíneo, prueba de Simonin incluida, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque en la etapa b):

- se ponen en contacto en distintos contenedores la suspensión de eritrocitos procedente de la muestra obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo anti-A y un anticuerpo de ensayo anti-B, y
- se ponen en contacto en otros contenedores distintos la suspensión de eritrocitos procedente de la muestra obtenida en la etapa a) con un anticuerpo de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo, fuera del antígeno A y B, del cual se busca determinar la presencia o la ausencia sobre los eritrocitos de la muestra, conteniendo cualquier otro contenedor una sola especificidad de anticuerpo; y
- se ponen en contacto en distintos contenedores la suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A y de grupo B obtenida en la etapa a), después de la mezcla de una suspensión de eritrocitos de ensayo con una solución acuosa de ferrofluido, con una muestra de plasma o de suero del individuo,

25 caracterizado porque en la etapa f) se evalúa mediante lectura a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura apropiado, la presencia eventual de aglutinados eritrocitarios en cada uno de dichos contenedores, permitiendo el conjunto de estas lecturas determinar el grupo ABO del individuo y determinar el fenotipo del individuo para los otros antígenos de grupo sanguíneo buscados.

30 33. Procedimiento según la reivindicación 30 o 32, caracterizado porque en la etapa b) la muestra de plasma o de suero del individuo se pone en contacto también con una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo O obtenida en la etapa a).

35 34. Dispositivo para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno del grupo sanguíneo en la superficie de un eritrocito de una muestra, caracterizado porque comprende:

- a) un contenedor que contiene una solución de ferrofluido tal como se define en las reivindicaciones 1 a 13;
- b) un contenedor que contiene la suspensión de eritrocitos de la muestra que se debe ensayar;
- c) uno o varios contenedores de reacción que contiene un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo.
- d) por lo menos un imán o un conjunto de imanes que pueden estar dispuestos en el exterior de dicho o de dichos contenedores y debajo de dicho o dichos contenedores;
- e) un sistema de agitación de dicho o dichos contenedores.

40 35. Dispositivo según la reivindicación 34, caracterizado porque dicho contenedor de reacción es una cúpula de microplaca.

45 50 55 60 65

36. Dispositivo según la reivindicación 34 o 35, para el grupo sanguíneo ABO de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque:

- 5 - dichos contenedores que contienen una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo conocido contienen distintamente una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A, una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo B; y
- 10 - dichos contenedores que contienen un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo contienen distintamente un anticuerpo anti-A y un anticuerpo anti-B.

37. Dispositivo según la reivindicación 34 o 35, para el fenotipaje sanguíneo, fuera de la prueba de Simonin, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque:

- 15 - dichos contenedores contienen distintamente un anticuerpo de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo del cual se busca determinar la presencia o la ausencia sobre los eritrocitos de la muestra.

38. Dispositivo según la reivindicación 34 o 35, para el fenotipaje sanguíneo, prueba de Simonin incluida, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque:

- 20 - dichos contenedores que contienen una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo conocido contienen distintamente una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A, una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo B; y
- 25 - dichos contenedores que contienen un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo contienen distintamente un anticuerpo anti-A, un anticuerpo anti-B y un anticuerpo de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo, fuera de ABO, del cual se busca determinar la presencia o la ausencia sobre los eritrocitos de la muestra.

39. Kit para la determinación por reacción de aglutinación de eritrocitos de la presencia de un antígeno del grupo sanguíneo en la superficie de un eritrocito de una muestra, caracterizado porque comprende:

- 30 a) uno o varios contenedores de reacción que contienen distintamente un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo;
- 35 b) una solución de ferrofluido tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 13; y
- c) uno o varios imanes pueden ser dispuestos en el exterior debajo del o de los contenedores de reacción.

40. Kit según la reivindicación 39, para el agrupamiento sanguíneo ABO de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque:

- 40 - dichos contenedores, que contienen además una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo A, y una suspensión de eritrocitos de ensayo de grupo B; y
- 45 - dichos contenedores que contienen un anticuerpo de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo contienen distintamente un anticuerpo anti-A y un anticuerpo anti-B.

41. Kit según la reivindicación 40, para el fenotipaje sanguíneo, prueba de Simonin incluida, de una muestra de sangre total procedente de un individuo, caracterizado porque comprende además por lo menos tantos contenedores que contienen distintamente anticuerpos de ensayo específico del antígeno de grupo sanguíneo, diferente del antígeno A y B, del cual se busca determinar la presencia o la ausencia sobre los eritrocitos de la muestra a fenotipar.

42. Kit según una de las reivindicaciones 39 a 41, caracterizado porque dichos anticuerpos de ensayo anti-antígeno de grupo sanguíneo contenidos en dichos contenedores están en forma desecada.

43. Kit según una de las reivindicaciones 39 a 42, caracterizado porque dichos contenedores son unas cúpulas de microplaca.