



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 444 430

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 26.03.2009 E 09761240 (2)
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 18.12.2013 EP 2315024

(54) Título: Un procedimiento de determinación rápida del grupo sanguíneo ABO/Rh/MN y un kit de prueba del mismo

(30) Prioridad:

10.06.2008 CN 200810111567

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: **25.02.2014**

(73) Titular/es:

INTEC PRODUCTS, INC. (XIAMEN) (100.0%) No. 332 Xinguang Road Xinyang Industry Area Haicang Xiamen Fujian 361022, CN

(72) Inventor/es:

WANG, DAMING; YANG, WEN; XIAO, JIANGQUN y WANG, BAODAN

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

DESCRIPCIÓN

Un procedimiento de determinación rápida del grupo sanguíneo ABO/Rh/MN y un kit de prueba del mismo

Campo técnico

5

10

15

35

55

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar rápidamente el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano y un kit del mismo como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

La determinación del grupo sanguíneo es una técnica convencional para agrupar los glóbulos rojos humanos de acuerdo con el sistema ABO con cuatro grupos diferentes de A, B, AB y O, de acuerdo con el sistema Rh y el sistema de grupo sanguíneo MN respectivamente. Un procedimiento general para identificar el grupo sanguíneo es mezclar los glóbulos rojos que se van a detectar con un reactivo que contiene un anticuerpo del grupo sanguíneo, y, después de la reacción de lo anterior, determinar el grupo sanguíneo de los glóbulos rojos detectados observando la aparición de aglutinación de glóbulos rojos. Dicho procedimiento comprende en primer lugar aislar los glóbulos rojos del suero de un paciente, a continuación mezclar una cantidad apropiada de los glóbulos rojos con las respectivas soluciones de prueba introducidas en un tubo de ensayo o portaobjetos (que contiene suero anti-A, anti-B, anti-D, anti-M o anti-N, respectivamente), y opcionalmente añadir otros reactivos que promueven la reacción inmunitaria e incubar la reacción, a continuación centrifugar y agitar la mezcla de reacción seguido de observar la aparición de aglutinación de glóbulos rojos.

Para una muestra, si se produce la aglutinación en presencia de un reactivo anti-A, aunque no se produzca aglutinación en presencia de un reactivo anti-B, entonces se identifica la muestra de sangre como un grupo sanguíneo de A. Si se produce la aglutinación de glóbulos rojos en presencia de un reactivo anti-B, aunque no se produzca aglutinación en presencia de un reactivo anti-A, entonces se identifica la muestra como un grupo sanguíneo de B. Si se produce la aglutinación de glóbulos rojos tanto en presencia de un reactivo anti-A como en presencia de un reactivo anti-B, entonces se identifica la muestra como un grupo sanguíneo de AB. Si no se produce ninguna reacción de aglutinación en presencia de un reactivo anti-A ni en presencia de un reactivo anti-B, entonces se identifica la muestra como un grupo sanguíneo de O. Si se produce la aglutinación en presencia de un reactivo anti-D, entonces la muestra es del grupo sanguíneo Rh-positivo, de lo contrario es del grupo sanguíneo Rh-negativo. Para el sistema de grupo sanguíneo MN, se puede designar que una muestra es del grupo sanguíneo M, N o MN de acuerdo con la aparición de aglutinación de glóbulos rojos.

Las tecnologías actuales usadas para determinar el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano se pueden clasificar en dos tipos. El primer tipo se basa en la detección del antígeno del grupo sanguíneo asociado con la membrana celular, e incluye un ensayo de aglutinación en solución salina, ensayo de neutralización, ensayo de absorción, ensayo de disociación y reacción de aglutinación mezclado de glóbulos rojos. El segundo tipo se basa en la detección directa del antígeno del grupo sanguíneo libre, e incluye reacción de coagulación y radioinmunoensayo.

Actualmente en el ensayo de aglutinación en solución salina de glóbulos rojos usado comúnmente, se determina la sangre de prueba con su grupo sanguíneo por aglutinación de glóbulos rojos inducida por la unión del anticuerpo IgM o IgG conocido al antígeno del grupo sanguíneo sobre la superficie de glóbulos rojos recién extraídos. Este procedimiento se usa ampliamente en la determinación del grupo sanguíneo (blood typing, en inglés) para la transfusión de sangre clínica. Sin embargo, este procedimiento necesita los reactivos correspondientes, que se deben preservar a baja temperatura, y además, su resultado es difícil de confirmar.

Otros procedimientos para determinar el grupo sanguíneo tienen varias deficiencias. Por ejemplo, el ensayo de neutralización se lleva a cabo en un periodo de tiempo largo y tiene una mala sensibilidad. La prueba de disociación y la reacción de aglutinación mezclada requieren un funcionamiento altamente cualificado con una optimización complicada en cada en cada serie y tiene una mala sensibilidad. La reacción de coaglutinación comprende sensibilizar la proteína A de Staphylococcus aureus (SPA) por el anticuerpo IgG, a continuación observar la aglutinación de Staphylococcus aureus para determinar el grupo sanguíneo de la muestra sometida a prueba, aunque este procedimiento requiere un almacenamiento complicado de los reactivos. El radioinmunoensayo y ELISA son altamente sensibles, aunque tienen un tiempo de ejecución largo, y por tanto no son adecuados para una única muestra o para una detección in situ.

Judith Parke y Deborah Lynne Morris (documento GB2250342A, 1992) divulgan un procedimiento y dispositivo para la determinación de los grupos sanguíneos humanos basado en la aglutinación de glóbulos rojos. Se usa PE hidrófilo en el dispositivo como material para la aplicación de la muestra de sangre. Además, se dispusieron múltiples zonas de aplicación a lo largo de la tira de prueba.

D.E. NeValainen et al (documento EP022397S, 1987) divulgan procedimientos y dispositivos para determinar las clasificaciones de grupos sanguíneos a partir de muestras de sangre o suero. Se usa un sustrato sólido poroso que tiene un tamaño de poro promedio de 0,025 a 7 μ m en dispositivos como el de carga de sangre.

Peter Schwind y Klemens Loster (documento US2007/0248983A1, 2007) divulgan un dispositivo y procedimiento para identificar simultáneamente antígenos de grupos sanguíneos. El dispositivo tiene una zona de aplicación y una región de zona indicadora en dos localizaciones separadas. Se usa un material orgánico poroso tal como nitrocelulosa, polietileno o nailon como material para la aplicación de sangre.

5 En resumen, los procedimientos usados comúnmente para la determinación del grupo sanguíneo clínico tienen varios problemas tales como un tiempo de funcionamiento largo, trabajo laborioso, un resultado subjetivo con una gran variación y contaminación potencial. Por lo tanto, es necesario realizar una mejora sustancial de los procedimientos convencionales para la determinación del grupo sanguíneo.

Sumario de la invención

35

40

- Un objetivo de la presente invención es proporcionar un kit para llevar a cabo un procedimiento para detectar rápidamente el grupo sanguíneo ABO/Rh/ MN humano, consistiendo el kit en una tira de prueba, una solución de aclarado y un medio de recogida de sangre, en el que la tira de prueba consiste en una almohadilla de aclarado, una almohadilla de carga, una almohadilla de amortiguación, una almohadilla de absorción, una cinta adhesiva resistente al agua y una lámina de poliéster como soporte, y en el que la almohadilla de aclarado, la almohadilla de carga, la almohadilla de amortiguación y la almohadilla de absorción que forman la tira de prueba están fabricadas de un material de fibra de vidrio polimérico poroso que tiene un tamaño de poro apropiado para que al menos un glóbulo rojo pase a través de él,
- en el que la almohadilla de aclarado, la almohadilla de carga, la almohadilla de amortiguación, la almohadilla de absorción y la cinta adhesiva resistente al agua están unidas secuencialmente al soporte, el borde de la almohadilla de carga se superpone sobre el borde de la almohadilla de aclarado, el borde de la almohadilla de amortiguación se superpone en el borde de la almohadilla de carga, el borde de la almohadilla de absorción se superpone en el borde de la almohadilla de amortiguación, y la cinta adhesiva resistente al agua se aplica sobre los bordes superpuestos de la almohadilla de aclarado y la almohadilla de carga, para prevenir que la solución de aclarado se salga de la almohadilla de carga,
- comprendiendo el procedimiento las etapas de gotear una muestra de sangre sobre la almohadilla de carga de la tira de prueba precubierta por inmovilización con anticuerpo anti-A o anti-B o anti-D o anti-M o anti-N, gotear una solución de aclarado sobre un extremo de la tira de prueba para llevar los glóbulos rojos no aglutinados junto con la solución de aclarado lejos del sitio de carga, mientras que deja los glóbulos rojos aglutinados con el anticuerpo restante en el sitio de carga; a continuación determinar el grupo sanguíneo de la muestra de acuerdo con la presencia de glóbulos rojos aglutinados en el sitio de carga como sitio de reacción.
 - Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para detectar rápidamente el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano usando el kit de la invención, comprendiendo las etapas de gotear una muestra de sangre sobre la almohadilla de carga de la tira de prueba precubierta por inmovilización con anticuerpo anti-A o anti-B o anti-D o anti-M o anti-N, gotear una solución de aclarado sobre un extremo de la tira de prueba para llevar los glóbulos rojos no aglutinados junto con la solución de aclarado lejos del sitio de carga, mientras que deja los glóbulos rojos aglutinados con el anticuerpo restante en el sitio de carga; a continuación determinar el grupo sanguíneo de la muestra de acuerdo con la presencia de glóbulos rojos aglutinados en el sitio de carga como sitio de reacción.
 - De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, la muestra de sangre goteada sobre la tira de prueba puede tener un volumen tan pequeño como de 1-10 µl. Dicha solución de aclarado es solución salina tamponada con fosfato 10 mM (PBS), solución salina fisiológica u otra solución isotónica. Dicha muestra de sangre que se va a someter a prueba se gotea sobre una almohadilla de carga de la tira de prueba.
 - De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, el procedimiento para inmovilizar el anticuerpo del grupo sanguíneo puede estar basado, por ejemplo, en la adsorción física o la reticulación química.
- De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, dicha muestra de sangre que se va a someter a prueba puede ser glóbulos rojos o sangre completa, o una suspensión de glóbulos rojos o sangre completa diluida con una solución isotónica tal como solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato. Además, dicha muestra de sangre incluye una muestra de sangre parcialmente hemolizada y una muestra de sangre rica en lípidos.
 - De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, los resultados de la prueba se pueden determinar visualmente o en virtud de un dispositivo para recogida de señales de foto o eléctricas.
- En resumen, una muestra de sangre se pone en contacto y reacciona con la almohadilla de carga inmovilizada con un anticuerpo de grupo sanguíneo correspondiente, es decir, la muestra de sangre sufre una reacción de unión inmunológica con anticuerpo correspondiente sobre la almohadilla de carga. Después de que se aclare con una solución de aclarado, la muestra de sangre que ha sufrido la reacción de unión inmunológica permanece sobre la almohadilla y tiene un color rojo significativo, mientras que la muestra de sangre que no ha sufrido ninguna reacción de unión inmunológica se separa por aclarado de la almohadilla de carga por la solución de aclarado y por tanto no aparece color rojo en el sitio de carga. Por lo tanto, se puede determinar el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN de una muestra de sangre por la aparición de la reacción inmunológica entre los glóbulos rojos en la muestra y el anticuerpo

del grupo sanguíneo, que se determina por la aparición de sustancia roja sobre la almohadilla de carga después de la reacción inmunitaria entre los glóbulos rojos y el anticuerpo del grupo sanguíneo.

Breve descripción de los dibujos

5

25

40

45

La figura 1 representa una tira de detección rápida ilustrativa para el grupo sanguíneo ABO en el kit de detección del grupo sanguíneo de la presente invención.

La figura 2 representa una vista desmontada de otra tira de detección rápida ilustrativa para el grupo sanguíneo ABO en el kit de detección de grupo sanguíneo de la presente invención, que comprende una almohadilla de aclarado 1, una cinta adhesiva resistente al agua 2, una almohadilla de carga 3 fijada con anticuerpo de grupo sanguíneo, una almohadilla de amortiquación 4, una almohadilla de absorción 5, y una lámina de soporte de poliéster 6.

La figura 3 representa una tira de detección rápida para el grupo sanguíneo Rh en el kit de la presente invención, que comprende una almohadilla de aclarado 1, una cinta adhesiva resistente al agua 2, una almohadilla de carga 3 fijada con un anticuerpo anti-D, una almohadilla de amortiguación 4, y una almohadilla de absorción 5.

La figura 4 representa una tira de detección rápida ilustrativa para el grupo sanguíneo MN en el kit de detección del grupo sanguíneo de la presente invención.

La figura 5 representa una reacción esquemática después de gotear una muestra de sangre positiva sobre una almohadilla de fibra de vidrio fijada con un anticuerpo de grupo sanguíneo, en la que 1 indica glóbulos rojos, 2 indica anticuerpo de grupo sanguíneo y 3 indica una almohadilla de carga de fibra de vidrio.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar rápidamente un grupo sanguíneo ABO/Rh/MN de una muestra de sangre humana que se va a someter aprueba y un kit del mismo como se define en las reivindicaciones.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un kit para llevar a cabo un procedimiento para detectar rápidamente el grupo sanguíneo ABO/Rh/ MN humano, consistiendo el kit en una tira de prueba, una solución de aclarado y un medio de recogida de sangre, en el que la tira de prueba consiste en una almohadilla de aclarado, una almohadilla de carga, una almohadilla de amortiguación, una almohadilla de absorción, una cinta adhesiva resistente al agua y una lámina de poliéster como soporte, y en el que la almohadilla de aclarado, la almohadilla de carga, la almohadilla de amortiguación y la almohadilla de absorción que forman la tira de prueba están fabricadas de un material de fibra de vidrio polimérico poroso que tiene un tamaño de poro apropiado para que al menos un glóbulo rojo pase a través de él,

en el que la almohadilla de aclarado, la almohadilla de carga, la almohadilla de amortiguación, la almohadilla de absorción y la cinta adhesiva resistente al agua están unidas secuencialmente al soporte, el borde de la almohadilla de carga se superpone sobre el borde de la almohadilla de aclarado, el borde de la almohadilla de amortiguación se superpone en el borde de la almohadilla de carga, el borde de la almohadilla de absorción se superpone en el borde de la almohadilla de amortiguación, y la cinta adhesiva resistente al agua se aplica sobre los bordes superpuestos de la almohadilla de aclarado y la almohadilla de carga, para prevenir que la solución de aclarado se salga de la almohadilla de carga,

comprendiendo el procedimiento las etapas de gotear una muestra de sangre sobre la almohadilla de carga de la tira de prueba precubierta por inmovilización con anticuerpo anti-A o anti-B o anti-D o anti-M o anti-N, gotear una solución de aclarado sobre un extremo de la tira de prueba para llevar los glóbulos rojos no aglutinados junto con la solución de aclarado lejos del sitio de carga, mientras que deja los glóbulos rojos aglutinados con el anticuerpo restante en el sitio de carga; a continuación determinar el grupo sanguíneo de la muestra de acuerdo con la presencia de glóbulos rojos aglutinados en el sitio de carga como sitio de reacción.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para detectar rápidamente el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano usando el kit de la invención, comprendiendo las etapas de gotear una muestra de sangre sobre la almohadilla de carga de la tira de prueba precubierta por inmovilización con anticuerpo anti-A o anti-B o anti-D o anti-M o anti-N, gotear una solución de aclarado sobre un extremo de la tira de prueba para llevar los glóbulos rojos no aglutinados junto con la solución de aclarado lejos del sitio de carga, mientras que deja los glóbulos rojos aglutinados con el anticuerpo restante en el sitio de carga; a continuación determinar el grupo sanguíneo de la muestra de acuerdo con la presencia de glóbulos rojos aglutinados en el sitio de carga como sitio de reacción.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, dicha muestra de sangre que se va a someter a prueba puede ser glóbulos rojos o sangre completa, o una suspensión de glóbulos rojos o sangre completa diluida con una solución isotónica tal como solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Además, dicha muestra de sangre puede incluir una muestra de sangre parcialmente hemolizada y una muestra de sangre rica en lípidos.

ES 2 444 430 T3

De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, el volumen de la muestra de sangre goteada sobre la tira de prueba no es más de 10 µl. Dicha solución de aclarado es solución salina tamponada con fosfato 10 mM, solución salina fisiológica y otras.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, el procedimiento para fijar el anticuerpo del grupo sanguíneo puede estar basado, por ejemplo, en la adsorción física o la reticulación química.

En la figura 1 se ilustra una tira de prueba para su uso en la invención.

10

15

20

25

30

35

55

En la invención, dicha almohadilla de aclarado, almohadilla de carga, almohadilla de amortiguación y almohadilla de absorción están fabricadas de materiales de fibra de vidrio poliméricos porosos en los que el tamaño de poro permite al menos que un único glóbulo rojo pase a través de ellos. En vista del material seleccionado, en general, la almohadilla de aclarado, la almohadilla de carga y la almohadilla de amortiguación a veces se denominan almohadilla de fibra de vidrio.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, la muestra de sangre que se va a someter a prueba se gotea sobre la almohadilla de carga, y dicha solución de aclarado se gotea sobre la almohadilla de aclarado. La almohadilla de carga es un soporte poroso fijado con un anticuerpo de grupo sanguíneo. Además, el procedimiento para fijar el anticuerpo de grupo sanguíneo puede estar basado en adsorción física o reticulación química.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, dicha muestra de sangre puede ser una muestra de sangre parcialmente hemolizada o una muestra de sangre rica en lípidos sanguíneos.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, los resultados de la prueba se pueden determinar visualmente o en virtud de un dispositivo para recogida y lectura de señales de foto o eléctricas. Específicamente, con el uso del kit de la presente invención, el procedimiento para detectar el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano comprende:

1) Fijar directa o indirectamente el anticuerpo del grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano sobre la almohadilla de carga 3 (Fig. 2): fijar el anticuerpo del grupo sanguíneo sobre la almohadilla de fibra de vidrio con un tamaño de poro usando adsorción física o reticulación química. El procedimiento de fijación física o química seleccionado tiene poco efecto sobre la actividad biológica de los anticuerpos. Además, el anticuerpo fijado está complementado con un agente protector de proteína, que se puede seleccionar del grupo que consiste en seroalbúmina bovina, suero de ternero, peptona, sacarosa, polivinilpirrolidona, y la combinación de los mismos.

Diluir el anticuerpo monoclonal del grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano de valoración alta con solución salina tamponada con fosfato 5 mM hasta una valoración apropiada, añadir un agente protector de anticuerpo para facilitar la fijación y conservación del anticuerpo sobre la almohadilla de fibra de vidrio. Se puede añadir un potenciador de reacción en la solución de anticuerpo diluido para promover la posterior reacción inmunitaria. Aplicar el anticuerpo diluido sobre la almohadilla de fibra de vidrio preactivada en una proporción de 1,5 ml de anticuerpo por 5 cm x 5 cm de almohadilla de fibra y a continuación preservar en un cierre hermético después de secar a 37 °C.

- 2) Gotear la muestra de prueba sobre la almohadilla de carga 3, seguido de gotear la solución de aclarado sobre la almohadilla de aclarado 2 (véase la fig. 3). Después de cargar la muestra y gotear la solución de aclarado, se produce una reacción de unión inmunitaria y se presenta el resultado.
 - 3) Después de completar la reacción y un aclarado adicional, determinar el grupo sanguíneo de la muestra de prueba de acuerdo con la presencia de residuo rojo sobre la almohadilla de carga.

Para una tira de prueba de grupo sanguíneo ABO, después de que se aclare la reacción, si permanece una cantidad 40 sustancial de sustancia roja sobre la almohadilla de carga que contiene el anticuerpo anti-A, indica que la muestra de sangre se captura por el anticuerpo anti-A y de este modo se produce la reacción de aglutinación entre ambos (es decir, reacción positiva); si no permanece cantidad sustancial de sustancia roja sobre la almohadilla de carga que contiene el anticuerpo anti-A, indica que no se produce reacción de aglutinación entre la muestra de sangre y el anticuerpo anti-A (es decir. reacción negativa): si permanece una cantidad sustancial de sustancia roia sobre la 45 almohadilla de carga que contiene anticuerpo anti-B después de aclarar la reacción completada, indica que se produce la reacción de aglutinación entre la muestra de sangre y el anticuerpo anti-B; si no permanece cantidad sustancial de sustancia roja sobre la almohadilla de carga que contiene el anticuerpo anti-B después de aclarar la reacción completada, indica que no se produce reacción de aglutinación entre la muestra de sangre y el anticuerpo anti-B. Por lo tanto, se puede determinar que, de acuerdo con los resultados de la prueba, una muestra de sangre que produce 50 reacción de aglutinación con ambos anticuerpos anti-A y anti-B es de grupo sanguíneo AB; una muestra de sangre que produce reacción de aglutinación solamente con el anticuerpo anti-A es de grupo sanguíneo A; una muestra de sangre que produce reacción de aglutinación solamente con el anticuerpo anti-B es de grupo sanguíneo B; y una muestra de sangre que no produce reacción de aglutinación con anticuerpo anti-A ni anticuerpo anti-B es de grupo sanguíneo O.

Para una tira de prueba de grupo sanguíneo Rh, después de que se aclare la reacción, si permanece una cantidad sustancial de sustancia roja sobre la almohadilla de carga que contiene anticuerpo anti-D, indica que se produce la reacción de aglutinación entre la muestra de sangre y el anticuerpo anti-D; mientras que si no permanece cantidad

sustancial de sustancia roja sobre la almohadilla de carga que contiene el anticuerpo anti-D, indica que no se produce reacción de aglutinación entre la muestra de sangre y el anticuerpo anti-D. Por lo tanto, se puede determinar que, de acuerdo con los resultados de la prueba, una muestra de sangre que produce reacción de aglutinación con el anticuerpo anti-D es del grupo sanguíneo Rh-positivo, mientras que una muestra de sangre que no produce reacción de aglutinación con el anticuerpo anti-D es del grupo sanguíneo Rh-negativo.

5

10

15

20

25

30

50

55

Para una tira de prueba de grupo sanguíneo MN, después de que se aclare la reacción, si permanece una cantidad sustancial de sustancia roja sobre la almohadilla de carga que contiene el anticuerpo anti-M, indica que la muestra de sangre se captura por el anticuerpo anti-M, y de este modo se produce la reacción de aglutinación entre ambos; si no permanece cantidad sustancial de sustancia roja sobre la almohadilla de carga que contiene el anticuerpo anti-M, indica que no se produce reacción de aglutinación entre la muestra de sangre y el anticuerpo anti-M; si permanece una cantidad sustancial de sustancia roja sobre la almohadilla de carga que contiene el anticuerpo anti-N, indica que se produce la reacción de aglutinación entre la muestra de sangre y el anticuerpo anti-N. Por lo tanto, se puede determinar que, de acuerdo con los resultados de la prueba, una muestra de sangre que produce reacción de aglutinación solamente con el anticuerpo anti-M es del grupo sanguíneo MN; una muestra de sangre que produce reacción de aglutinación solamente con el anticuerpo anti-M es del grupo sanguíneo M; y una muestra de sangre que produce reacción de aglutinación meramente con el anticuerpo anti-N es del grupo sanguíneo N.

En la presente invención, dicha tira de prueba rápida consiste en un soporte, una almohadilla de aclarado, una almohadilla de carga, una almohadilla de amortiguación, una almohadilla de absorción y una cinta adhesiva resistente al agua. La almohadilla de aclarado, la almohadilla de carga, la almohadilla de amortiguación, la almohadilla de absorción y la cinta adhesiva resistente al agua se unen secuencialmente al soporte. El borde de la almohadilla de carga se superpone sobre el borde de la almohadilla de aclarado, el borde de la almohadilla de amortiguación se superpone en el borde de la almohadilla de carga, el borde de la almohadilla de absorción se superpone en el borde de la almohadilla de amortiguación, mientras que la cinta adhesiva resistente al agua se aplica sobre los bordes superpuestos de la almohadilla de aclarado y la almohadilla de carga, para prevenir que la solución de aclarado se salga de la almohadilla de carga. El soporte está fabricado de una lámina de poliéster.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la presente invención, el término "fijar un anticuerpo" es equivalente a "inmovilizar un anticuerpo" y quiere decir fijar (inmovilizar) anticuerpo anti-A o anti-B o anti-D o anti-M o anti-N sobre un soporte tal como una almohadilla de fibra de vidrio que tiene un tamaño de poro u otro soporte que tiene un tamaño de poro similar, por ejemplo, por medio de reticulación física o química. Antes de la fijación, el anticuerpo se puede diluir en una proporción en vista de la valoración del anticuerpo, para lograr una concentración apropiada que se pueda usar. El anticuerpo se puede fijar sobre la almohadilla de fibra de vidrio (almohadilla de carga) por ejemplo, por empapado o aplicación uniforme o pulverización, a continuación se somete a secado por congelación u otro secado Dicho anticuerpo se puede pretratar con glutaraldehído como agente de reticulación.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la presente invención, dicha muestra de sangre que se va a someter a prueba puede ser glóbulos rojos o sangre completa, o una suspensión de glóbulos rojos diluida con una solución isotónica tal como solución salina tamponada con fosfato 10 mM (PBS) y solución salina fisiológica (normalmente diluida hasta un 2-50 %). Una muestra de sangre parcialmente hemolizada o rica en lípidos sanguíneos también puede ser aplicable para el kit de la presente invención.

Se puede añadir una muestra de prueba de sangre completa o células sanguíneas diluida o bien no diluida, a la almohadilla de carga fijada con un anticuerpo de grupo sanguíneo, después de permitir la reacción de unión inmunológica, se aclara la almohadilla de carga con una solución de aclarado. Dicha solución de aclarado puede ser solución salina tamponada con fosfato 10 mM (PBS) u otra. Después de permitir la reacción inmunitaria, la presencia de glóbulos rojos aglutinados se puede observar visualmente sin problemas, o los resultados de la prueba en lote se pueden leer por un dispositivo para recogida y lectura de señal óptica o eléctrica.

Para la detección del grupo sanguíneo ABO, se pueden llevar a cabo las operaciones del presente procedimiento sobre dos tiras de prueba que se forman por separado y en paralelo sobre la misma lámina de soporte de poliéster y se fijan sobre la almohadilla de carga respectivamente con el anticuerpo del grupo sanguíneo anti-A o anti-B.

Para la detección del grupo sanguíneo MN, se pueden llevar a cabo las operaciones del presente procedimiento sobre dos tiras de prueba que se forman por separado y en paralelo sobre la misma lámina de soporte de poliéster y se fijan sobre la almohadilla de carga respectivamente con el anticuerpo del grupo sanguíneo anti-M o anti-N.

El kit de detección rápida para el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN de la presente invención es adecuado para el cribado del grupo sanguíneo en un banco de sangre, recogida de sangre en área y autocomprobación doméstica para el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN. Se puede lograr una identificación del grupo sanguíneo rápida y creíble usando la reacción inmunitaria rápida y la lectura de resultados sencilla. El presente procedimiento es fácil de realizar y no es necesario reactivos adicionales tales como el reactivo de globulina anti-humano. En el presente procedimiento, el volumen de carga de la muestra de sangre puede ser de no más de 10 µl, y la duración total puede ser de no más de 2 minutos.

El procedimiento para la detección rápida del grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano de la presente invención y el kit del mismo se basan en el principio de inmunocromatografía, en el que la determinación del grupo sanguíneo se realiza

por la presencia de sustancia roja debida a la aglutinación de glóbulos rojos en la reacción antígeno-anticuerpo de sustancia de grupo sanguíneo. El presente procedimiento es fácil de realizar y evita varios defectos de los procedimientos comunes existentes para la detección del grupo sanguíneo en la técnica. El presente procedimiento es adecuado para la detección de una única muestra o bien para la detección de múltiples muestras, en especial para la detección del grupo sanguíneo ABO/Rh/MN en el sitio de recogida de sangre y para la autodetección domésticas del grupo sanguíneo. En combinación con un dispositivo relevante, el presente procedimiento se puede usar para un cribado de población rápido del grupo sanguíneo ABO/Rh/MN en lote en un banco de sangre.

Eiemplos

5

10

25

35

40

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar adicionalmente la presente invención, y estos ejemplos no limitarán la presente invención de ningún modo.

Ejemplo 1: La preparación de tiras de prueba del kit para la detección del grupo sanguíneo ABO humano y las etapas de detección de la misma

(1) Fijar el anticuerpo del grupo sanguíneo (anticuerpo anti-A, anti-B) sobre la almohadilla de carga:

Se diluyeron respectivamente anticuerpos monoclonales anti-A y anti-B de valoración alta (suministrados por Changchun Brother Biotech Co., Ltd) son solución salina tamponada con fosfato 5 mM hasta 1 ml con una valoración final de 64. Se añadió un agente protector de fijación de anticuerpo que consiste en seroalbúmina bovina al 5 %, sacarosa al 5 %, PVP al 5 % y suero de ternero al 5 % en PBS a la solución de anticuerpo diluido, para promover la fijación y conservación del anticuerpo sobre la almohadilla de fibra de vidrio. Se extendió el anticuerpo diluido sobre una almohadilla de fibra de vidrio preactivada en una proporción de 1,5 ml del anticuerpo diluido por 5 cm x 5 cm de la almohadilla de fibra de vidrio, y a continuación se secó el anticuerpo a 37 °C y se preservó en cierre hermético.

(2) Montar las tiras de prueba rápida:

Se unió una almohadilla de fibra de vidrio aclarada con la anchura de 20 mm sobre el centro de una lámina de soporte de poliéster con la anchura de aproximadamente 5-10 cm, a continuación se unieron secuencialmente una almohadilla de carga con la anchura de 10 mm, una almohadilla de amortiguación y una almohadilla de absorción con la anchura de 30 mm en ambos lados, y finalmente se fijaron de forma adhesiva la parte superpuesta de la almohadilla de aclarado y la almohadilla de carga con una cinta adhesiva resistente al agua, para prevenir que las almohadillas unidas se separaran y para prevenir que la solución de aclarado se extendiera. A continuación, la lámina de poliéster unida con dichas almohadillas se cortó en tiras con la anchura de 5 mm, y de este modo se obtuvieron tiras de prueba con la longitud de aproximadamente 5-10 cm y la anchura de aproximadamente 5 mm (véanse la figura 1 y figura 2).

30 (3) Detectar la muestra:

Se gotearon 5 µl de una muestra de sangre completa sobre la almohadilla de carga de la tira de prueba. Después del goteo de la muestra de prueba, se gotearon lentamente y con velocidad uniforme 5 gotas de una solución de aclarado sobre la almohadilla de aclarado 2. Se observó el color de la almohadilla de carga después de la cromatografía de la solución de aclarado. Que una cantidad sustancial de sustancia roja permanezca sobre la almohadilla de carga 3 indica una reacción positiva; mientras que si no permanece cantidad sustancial de sustancia roja sobre la almohadilla de carga 3 indica una reacción negativa. En combinación con el conocimiento sobre la relación del anticuerpo del grupo sanguíneo ABO y la reacción con glóbulos rojos, es fácil determinar el grupo sanguíneo de la muestra de prueba. De forma alternativa, se puede leer el residuo rojo sobre la almohadilla de carga por un sistema de recogida de señal de foto o de señal eléctrica, a continuación se pueden determinar automáticamente los resultados, para cribar rápidamente el grupo sanguíneo ABO de las muestras de sangre en lote.

Ejemplo 2: La preparación de tiras de prueba del kit para la detección del grupo sanguíneo Rh humano y las etapas de detección de la misma

(1) Fijar el anticuerpo del grupo sanguíneo (anticuerpo anti-D) sobre la almohadilla de carga:

Se diluyó un anticuerpo monoclonal anti-D de alta valoración (suministrado por MILLIPORE Corp.) con solución salina tamponada con fosfato 5 mM hasta 1 ml con una valoración final de 32. Se añadió un agente protector de fijación de anticuerpo que consiste en albúmina al 5 %, sacarosa al 5 %, PVP al 5 % y suero de ternero al 5 % en PBS a la solución de anticuerpo diluido, para promover la fijación y conservación del anticuerpo sobre la almohadilla de fibra de vidrio. Se añadió además un potenciador de reacción (Tween 20 al 2 % y Triton X-100 al 2 % en PBS) para promover la posterior reacción inmunitaria. Se extendió el anticuerpo diluido sobre la almohadilla de fibra de vidrio preactivada en una proporción de 1,5 ml del anticuerpo diluido por 5 cm x 5 cm de la almohadilla de fibra, y a continuación se secó el anticuerpo a 37 °C y se preservó en cierre hermético (véase la figura 3).

Otras etapas fueron similares a estas en la preparación de tiras de prueba del kit para la detección del grupo sanguíneo ABO humano y las etapas de detección de la misma

ES 2 444 430 T3

Ejemplo 3: La preparación de tiras de prueba del kit para la detección del grupo sanguíneo MN humano y las etapas de detección de la misma

La preparación de tiras de prueba del kit de detección para el grupo sanguíneo MN humano y las etapas de detección de la misma son las mismas que las de la preparación de tiras de prueba del kit de detección para el grupo sanguíneo Rh humano y las etapas de detección de la misma, excepto en que el anticuerpo fijado sobre la tira de prueba se reemplazó con el anticuerpo anti-M y anti-N (véase la figura 4).

5

Ejemplo 4: La comparación del presente procedimiento para la detección del grupo sanguíneo con los procedimientos convencionales existentes.

Se detectó un grupo sanguíneo en 1500 individuos a partir de una población general (donantes de sangre) en doble ciego, usando procedimientos convencionales para la detección del grupo sanguíneo en paralelo junto con y los presentes procedimientos y el kit del mismo. Los resultados mostraron que los resultados de detección del presente procedimiento eran consistentes en un 100 % con los del procedimiento conocido basado en aglutinación en suspensión de glóbulos rojos. Además, el presente procedimiento se puede aplicar a las muestras en un intervalo más amplio, tales como muestra de sangre parcialmente hemolizada y muestra de sangre rica en lípidos. Además, el presente procedimiento evita los defectos del procedimiento común existente para la identificación del grupo sanguíneo clínico, tal como tiempo de operación largo, trabajo laborioso, resultado subjetivo con una gran variación debida al operario, y contaminación potencial.

REIVINDICACIONES

- 1. Un kit para llevar a cabo un procedimiento para detectar rápidamente el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano,
- consistiendo el kit en una tira de prueba, una solución de aclarado y un medio de recogida de sangre, en el que la tira de prueba consiste en una almohadilla de aclarado, una almohadilla de carga, una almohadilla de amortiguación, una almohadilla de absorción, una cinta adhesiva resistente al agua y una lámina de poliéster como soporte, y en el que la almohadilla de aclarado, la almohadilla de carga, la almohadilla de amortiguación y la almohadilla de absorción que forman la tira de prueba están fabricadas de un material de fibra de vidrio polimérico poroso que tiene un tamaño de poro apropiado para que al menos un glóbulo rojo pase a través de él,
- en el que la almohadilla de aclarado, la almohadilla de carga, la almohadilla de amortiguación, la almohadilla de absorción y la cinta adhesiva resistente al agua están unidas secuencialmente al soporte, el borde de la almohadilla de carga se superpone sobre el borde de la almohadilla de aclarado, el borde de la almohadilla de amortiguación se superpone en el borde de la almohadilla de carga, el borde de la almohadilla de absorción se superpone en el borde de la almohadilla de amortiguación, y la cinta adhesiva resistente al agua se aplica sobre los bordes superpuestos de la almohadilla de aclarado y la almohadilla de carga, para prevenir que la solución de aclarado se salga de la almohadilla de carga.

20

- comprendiendo el procedimiento las etapas de gotear una muestra de sangre sobre la almohadilla de carga de la tira de prueba precubierta por inmovilización con anticuerpo anti-A o anti-B o anti-D o anti-M o anti-N, gotear una solución de aclarado sobre un extremo de la tira de prueba para llevar los glóbulos rojos no aglutinados junto con la solución de aclarado lejos del sitio de carga, mientras que deja los glóbulos rojos aglutinados con el anticuerpo restante en el sitio de carga; a continuación determinar el grupo sanguíneo de la muestra de acuerdo con la presencia de glóbulos rojos aglutinados en el sitio de carga como sitio de reacción.
- El kit de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la tira de prueba está configurada para permitir que una muestra de sangre se gotee sobre la almohadilla de carga fijada con un anticuerpo del grupo sanguíneo, y una solución de aclarado isotónica se gotee sobre la almohadilla de aclarado, a continuación la presencia de glóbulos rojos aglutinados en la almohadilla de carga se observa para determinar el grupo sanguíneo de la muestra de sangre.
- 3. Un procedimiento para detectar rápidamente el grupo sanguíneo ABO/Rh/MN humano usando el kit de la reivindicación 1, comprendiendo las etapas de gotear una muestra de sangre sobre la almohadilla de carga de la tira de prueba precubierta por inmovilización con anticuerpo anti-A o anti-B o anti-D o anti-M o anti-N, gotear una solución de aclarado sobre un extremo de la tira de prueba para llevar los glóbulos rojos no aglutinados junto con la solución de aclarado lejos del sitio de carga, mientras que deja los glóbulos rojos aglutinados con el anticuerpo restante en el sitio de carga; a continuación determinar el grupo sanguíneo de la muestra de acuerdo con la presencia de glóbulos rojos aglutinados en el sitio de carga como sitio de reacción.
- 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la muestra de sangre está seleccionada del grupo que consiste en glóbulos rojos, sangre completa, glóbulos rojos diluidos con solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato isotónica y sangre completa diluida con solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato isotónica.
- 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la muestra de sangre está seleccionada del grupo que consiste en una muestra de sangre que está parcialmente hemolizada y una muestra de sangre que es rica en lípidos.
 - 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo está fijado sobre la tira de prueba por adsorción física o reticulación química.
- 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la presencia de la aglutinación en el sitio de carga como sitio de reacción se puede determinar visualmente o usando un dispositivo que recoge señal óptica o señal eléctrica.

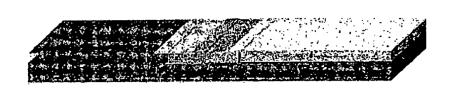


Fig. 1

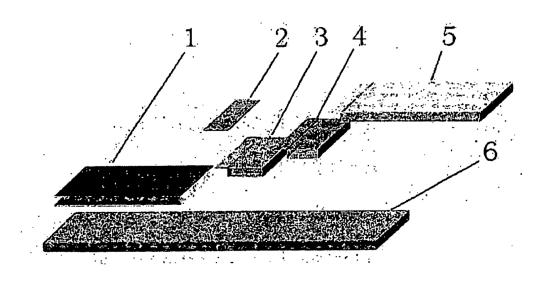


Fig. 2

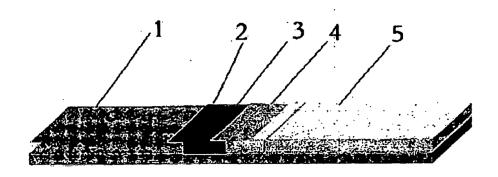


Fig. 3



Fig. 4

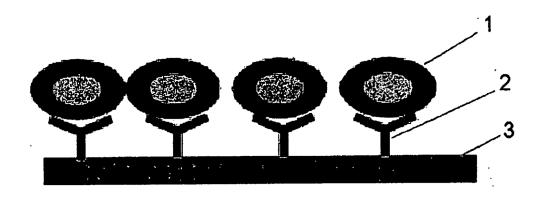


Fig. 5