

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 879**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/545** (2006.01)

**G01N 33/80** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2008 E 08806156 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2167967**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento de identificación y de determinación de grupos sanguíneos**

30 Prioridad:

**02.07.2007 FR 0704741**

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

**16.09.2015**

73 Titular/es:

**ABO DIAG (100.0%)  
12 allée Isaac Newton  
33650 Martillac, FR**

72 Inventor/es:

**CHAÏBI, NAJIM**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 545 879 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Dispositivo y procedimiento de identificación y de determinación de grupos sanguíneos.

5 La presente invención se refiere a un dispositivo para la identificación y la determinación de antígenos eritrocitarios de grupos sanguíneos y de los anticuerpos plasmáticos correspondientes a partir de una muestra de sangre entera.

La invención se refiere asimismo a la utilización de este dispositivo, a un procedimiento que utiliza este dispositivo, así como a un kit de determinación de los grupos sanguíneos.

10 La sangre es un tejido conjuntivo líquido presente en el hombre y en la mayoría de los animales evolucionados. A pesar de una composición celular idéntica, existe una variabilidad de los diversos elementos de la sangre, definidos por diferentes sistemas antigénicos denominados grupos sanguíneos.

15 En la práctica, se refiere más particularmente a los grupos sanguíneos eritrocitarios, sistemas de antígenos situados en la superficie de los glóbulos rojos, tales como, por ejemplo, los sistemas ABO, Rhesus, Kell, Duffy, MNS, Lewis, etc.

20 Clásicamente, la determinación de un grupo sanguíneo se realiza sobre el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Cuando un anticuerpo específico del antígeno reconoce a este último, se fija. Generalmente, los anticuerpos utilizados en el reconocimiento de grupos sanguíneos son unas inmunoglobulinas IgM que aglutinan los glóbulos rojos.

25 Las técnicas utilizadas habitualmente consisten en buscar e identificar la presencia o la ausencia de antígenos de grupo sanguíneo en la superficie de los eritrocitos, o en buscar e identificar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-antígeno del grupo sanguíneo en el plasma.

30 En particular, para el sistema ABO, la prueba de Beth-vincent permite determinar los antígenos llevados por los glóbulos rojos, y la prueba complementaria de Simonin-Michon o la contraprueba serológica permite determinar los anticuerpos que circulan en el suero.

35 En la prueba de Beth-vincent, los glóbulos rojos del individuo, obtenidos después de la separación de fase de las células y del plasma, o bien por centrifugación, o bien por decantación, son puestos en presencia de reactivos anticuerpos de especificidad conocida. Generalmente, esta prueba se hace visible por observación de aglutinación de los glóbulos rojos cuando los anticuerpos reconocen los antígenos eritrocitarios correspondientes.

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

45 Para la búsqueda de anticuerpos denominados irregulares o RAI, se trata de detectar la presencia o la ausencia en la sangre de un individuo de inmunoglobulinas dirigidas contra diversos antígenos eritrocitarios del individuo. Para ello, se busca poner en evidencia la fijación de estas inmunoglobulinas sobre los glóbulos rojos de prueba cuyos antígenos son conocidos, con la técnica de Coombs directa e indirecta, permitiendo la comparación de los resultados deducir la presencia o la ausencia de inmunoglobulinas.

50 Existe un gran número de procedimientos y dispositivos utilizados para el fenotipaje en el campo de la inmunología-hematología, pudiendo las técnicas ser manuales, en placa de opalina, en tubo o en pocillo de microplaca, o también completamente automatizadas con la ayuda de un robot distribuidor de la muestra y de un reactivo, agitador, incubador y lector automático. Se conocen en particular dos técnicas de referencia: las técnicas de microplacas y las técnicas de filtración por gel de ensayo.

No obstante, estas técnicas existentes de fenotipaje de grupos sanguíneos adolecen de numerosos inconvenientes.

55 Las técnicas de microplaca, por ejemplo, necesitan una fase de agitación que es crítica, ya que las múltiples reacciones simultáneamente presentes sobre el soporte no tienen la misma cinética de resuspensión. Deben ser realizadas bajo el control visual y es necesario estar particularmente atento a los fenómenos de adherencia de algunos reactivos.

60 Asimismo, en la realización de técnicas de filtración por gel de ensayo, existe también un riesgo de no detección de algunas aglutinaciones, en particular en la prueba plasmática del grupo ABO. Otro inconveniente es la detección demasiado frecuente de auto-anticuerpos en relación con las preparaciones de hematíes de ensayo, en particular las tratadas por unas enzimas proteolíticas.

65 Además, todas estas técnicas adolecen de un inconveniente principal, debido a que necesitan una centrifugación previa de la sangre entera con el fin de separar los elementos constitutivos de la sangre, etapa limitativa que

aumenta en gran medida el tiempo y el coste del análisis, y que necesita la utilización de centrifugadoras voluminosas y difíciles de manipular.

5 Con el fin de suprimir esta etapa pesada de centrifugación, se han desarrollado unas variantes, basadas en la utilización de partículas magnéticas.

10 Se puede citar a título de ejemplo la solicitud de patente EP 0 351 857 que describe un procedimiento de determinación inmunológica que utiliza unos marcadores magnetizados tales como unos anticuerpos o unos antígenos fijados sobre bolas de látex magnéticas. Se describe en particular una técnica RAI por inmunoadherencia en la que se aplica un campo magnético sobre unos hematíes previamente fijados en el fondo de un pocillo de microplaca, sensibilizados con el suero a ensayar, lavados y mezclados con unas bolas de látex magnéticas revestidas de una anti-inmunoglobulina.

15 Se conoce también la solicitud EP 0 230 768 que describe un procedimiento de co-agregación de partículas magnéticas capaces de unirse a una sustancia contenida en una muestra mediante compuestos policatiónicos en presencia de un campo magnético.

20 Sin embargo, estas diferentes técnicas adolecen también de numerosos inconvenientes. Son difíciles y largas de realizar, poco económicas y necesitan la utilización de dispositivos complejos y de poca movilidad.

La patente US nº 5.126.276 describe un dispositivo de detección de analitos en un fluido biológico, que comprende un soporte sólido constituido por una tarjeta sólida con varias lengüetas planas en la periferia de la tarjeta, en el que por lo menos las lengüetas comprenden una zona reactiva.

25 La patente US nº 5.710.049 describe un dispositivo de análisis de muestras con un trazador metálico. El documento US 2004/0096356 describe un dispositivo que permite la detección de analitos de productos lácteos.

El documento WO 2006/098803 describe un sistema para detectar la presencia de un analito en un fluido.

30 El documento GB 2 250 342 describe un dispositivo de determinación de grupo sanguíneo, que comprende unas zonas reactivas, en el que la zona de depósito de la muestra es distinta de las zonas reactivas y de la zona en la que se lee el resultado.

35 Asimismo, la presente invención pretende paliar los inconvenientes de la técnica anterior proponiendo un medio simple y eficaz para el fenotipaje de grupos sanguíneos eritrocitarios, y la identificación y determinación de los anticuerpos plasmáticos correspondientes, que presenta una precisión y una exactitud por lo menos comparables a las obtenidas por los métodos de referencia.

40 En particular, el objetivo de la invención es proponer un sistema económico, fácil de usar, automatizable y móvil, capaz de determinar y detectar rápidamente unos grupos sanguíneos eritrocitarios por inmovilización de los glóbulos rojos directamente a partir de una muestra de sangre entera, sin la utilización de un equipo de centrifugación y/o de un aparato de medición cualquiera.

45 Para responder a este objetivo, la presente invención propone un dispositivo para la identificación y determinación de grupos sanguíneos a partir de una muestra de sangre entera, que comprende un soporte sólido que comprende por lo menos una zona reactiva en la que se deposita la sangre y en la que se lee el resultado, estando dicha zona reactiva constituida por lo menos por una membrana porosa de polímero de polietileno de alta densidad, que presenta unos poros de diámetros comprendidos 1 y 20  $\mu\text{m}$ , impregnada por unos reactivos anticuerpos monoclonales o unos reactivos antiglobulinas que permiten la inmovilización de los anticuerpos plasmáticos, y una membrana absorbente, destinada a recuperar el exceso de sangre de la muestra analizada. El dispositivo permite identificar y determinar unos antígenos eritrocitarios de grupos sanguíneos y/o unos anticuerpos plasmáticos correspondientes.

50 La invención prevé asimismo la utilización de este dispositivo, así como un procedimiento de fenotipaje de grupos sanguíneos eritrocitarios por reacción de inmovilización de los glóbulos rojos, utilizando este dispositivo.

60 Ventajosamente, la presente invención permite detectar y/o determinar un grupo sanguíneo eritrocitario rápidamente, directamente a partir de sangre entera, mediante un resultado de lectura por positividad, sin utilizar centrifugadora o equipos de medición. El dispositivo permite una detección simultánea de los antígenos de grupos sanguíneos y unos anticuerpos plasmáticos correspondientes.

Según un último aspecto, la invención también se refiere a un kit para la identificación y la determinación de antígenos eritrocitarios de grupos sanguíneos y de anticuerpos plasmáticos correspondientes.

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

- la figura 1 representa un esquema del dispositivo según la invención visto en perspectiva,
- 5 - la figura 2a representa una sección esquemática de un primer modo de realización de una zona reactiva de un dispositivo según la invención,
- la figura 2b representa una sección esquemática de un segundo modo de realización de un dispositivo según la invención, y
- 10 - la figura 3 representa una vista en perspectiva de un modo de realización del dispositivo según la invención.

El dispositivo según la invención está destinado a la determinación y/o a la detección de grupos sanguíneos eritrocitarios a partir de una muestra de sangre entera.

15 Como se representa en las figuras, comprende un soporte sólido 1 que comprende por lo menos una zona reactiva 4 en la que se deposita la sangre y en la que se lee el resultado, estando dicha zona reactiva constituida por lo menos por:

- 20 - una membrana porosa 3 de polímero de polietileno de alta densidad, que presenta unos poros de diámetro comprendido entre 1 y 20  $\mu\text{m}$ , impregnada por unos anticuerpos monoclonales o unos reactivos antiglobulinas que permiten la inmovilización de los anticuerpos plasmáticos, y
- una membrana absorbente 2, destinada a recuperar el exceso de sangre de la muestra analizada.

25 La membrana porosa de polímero 3 presenta unos poros de diámetro comprendido entre 1 y 20  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 1 y 14  $\mu\text{m}$ .

30 Según un modo de realización preferido, la membrana porosa 3 es transparente. Se trata de una membrana de polietileno de alta densidad, que presenta unas características particularmente adaptadas a la invención, en particular para la activación y la inmovilización de los anticuerpos. Aún más preferentemente, la membrana porosa 3 es tal que presenta una buena resistencia, una velocidad de migración rápida que corresponde a la adsorción de una gota de sangre entera en menos de 10 segundos, y una porosidad media de 7  $\mu\text{m}$ .

35 La membrana 3 está impregnada por unos reactivos anticuerpos monoclonales o unos reactivos antiglobulinas que permiten la inmovilización de los anticuerpos plasmáticos. A título de ejemplo, en el caso en el que el dispositivo se utiliza para una prueba de Beth-Vincent, la membrana 3 está impregnada de reactivos anticuerpos monoclonales, tales como unos anticuerpos anti-A1, anti-A2, anti-B, anti-AB o anti-D; en el caso en el que el dispositivo se utiliza para una prueba de Simonin, la membrana 3 está impregnada de reactivos antiglobulinas. Los reactivos de complejación están unidos de manera específica sobre la zona de actividad.

40 Los reactivos anticuerpos monoclonales o los reactivos antiglobulinas están fijados sobre la membrana 3 mediante cualquier medio apropiado. En particular, pueden estar fijados por adsorción pasiva y selectiva. Esta selectividad mejora la exactitud y la precisión del ensayo.

45 Según un variante ilustrada en la figura 2b, la o las zonas reactivas 4 del dispositivo comprenden también un filtro 5. Este filtro puede, por ejemplo, estar constituido por fibras de vidrio de diámetro comprendido entre 1 y 7  $\mu\text{m}$ .

50 Cuando el dispositivo se utiliza para la identificación y la determinación de anticuerpos en el plasma del individuo, este filtro 5 está preferentemente impregnado por unos reactivos capaces de aglutinar los eritrocitos, de manera que se retengan los glóbulos rojos y se deje pasar sólo el plasma cuando se deposita sangre entera. A título de ejemplo, estos reactivos pueden ser unas aglutininas de soja, lectinas o cualquier otra sustancia biológica o no que permita aglutinar unos glóbulos rojos.

55 Estos reactivos de aglutinación están fijados sobre el filtro 5 mediante cualquier medio apropiado. En particular, pueden ser fijados por adsorción.

60 Según un modo de realización particular de la invención representado en la figura 3, el dispositivo comprende también un depósito 6 que contiene una solución de lavado y/o de revelación. Este depósito puede estar fijado de manera solidaria al dispositivo.

El dispositivo según la invención se puede utilizar para determinar y/o detectar unos grupos sanguíneos, en particular unos grupos sanguíneos ABO, Rhesus y RAI, a partir de una muestra de sangre entera.

65 El dispositivo según la invención se puede utilizar en particular para la realización de un procedimiento de fenotipaje de grupos sanguíneos eritrocitarios por reacción de inmovilización de eritrocitos, que comprende las etapas siguientes:

- depositar una muestra de sangre entera en una zona reactiva 4,
- dejar reaccionar por lo menos durante 30 segundos, y
- aplicar una solución de lavado con el fin de eluir los elementos no unidos a la membrana porosa 3.

5 Cuando la sangre está depositada sobre la zona reactiva 4, los elementos de la sangre capaces de unirse específicamente a los reactivos anticuerpos monoclonales o a los reactivos antiglobulinas de la membrana porosa 3 son captados en dicha membrana. Cuando se aplica la solución de lavado, tal como una solución de lavado PBS-tween, los elementos de la sangre no fijados a la membrana 3 son eliminados hacia la membrana tampón 2.

10 La lectura del resultado se realiza por positividad de manera macroscópica. Si unos hematíes están inmovilizados en la membrana porosa 3, el resultado se traduce por una coloración de la zona reactiva 4.

15 Según un modo de realización de la invención particularmente adaptado al fenotipaje de grupos sanguíneos ABO, Rhesus y RAI, la membrana 3 es impregnada por unos reactivos anticuerpos anti-antígenos específicos de los eritrocitos, tales como, por ejemplo, unos anticuerpos anti-A1, anti-A2, anti-B, anti-AB o anti-D. La membrana 3 desempeña entonces el papel de una trampa para los glóbulos rojos que permite su fijación sobre las inmunoglobulinas fijadas previamente en la zona reactiva. Los reactivos anticuerpos unidos de manera específica en la zona reactiva permiten una captación de los glóbulos rojos que provoca una inmovilización de estos últimos.

20 Además, este fenómeno está amplificado por una aglutinación de hecho, debida a algunos residuos de anticuerpos no eluidos por la solución de lavado.

25 Cuando los glóbulos rojos de la muestra sanguínea depositada en la zona reactiva llevan el antígeno que corresponde al anticuerpo presente en la zona reactiva, aparece una reacción de captación y de inmovilización de los glóbulos rojos que se traduce visualmente por una coloración roja de la zona reactiva.

30 Cuando los glóbulos rojos no son reconocidos por los anticuerpos correspondientes, éstos son eluidos hacia la membrana tampón 2 y hay una ausencia de coloración en la zona reactiva.

35 Ventajosamente, este procedimiento no utiliza ninguna técnica de coloración para la revelación y la lectura del resultado, ni ningún dispositivo particular para observar una aglutinación.

Además, el procedimiento según la invención permite evitar unas pseudo-aglutinaciones, fuente de errores en particular en las prácticas en gel de ensayo de la técnica anterior.

Según otro modo de realización de la invención particularmente adecuado para el fenotipaje de grupos ABO, Rhesus y RAI, la membrana 3 está impregnada por unos reactivos antiglobulinas que permiten la inmovilización de todos los anticuerpos plasmáticos del individuo.

40 La sangre entera es depositada en una zona reactiva 4 provista de un filtro 5 impregnado por unos reactivos de aglutinación. Los hematíes se aglutinan a nivel de este filtro y sólo el plasma alcanza la membrana porosa 3.

45 La membrana 3 desempeña entonces el papel de una trampa para los anticuerpos plasmáticos circulantes, que se unen a los reactivos antiglobulinas fijados previamente.

Después, se depositan unos hematíes de ensayo de antigenicidad en la membrana 3, se deja que actúen por lo menos durante 30 segundos y se aplica una solución de lavado con el fin de eluir los elementos no unidos a la membrana porosa 3.

50 Cuando los anticuerpos plasmáticos de la muestra sanguínea unidos a la membrana 3 por fijación a las antiglobulinas, reconocen los hematíes de ensayo correspondientes, estos últimos se fijan y se inmovilizan a nivel de la membrana porosa 3. El resultado se traduce visualmente por una coloración relacionada con la inmovilización de los hematíes de ensayo aplicados.

55 Cuando los anticuerpos plasmáticos inmovilizados en el soporte no reconocen los hematíes de ensayo, estos últimos son eliminados por la solución de lavado hacia la membrana tampón.

60 Preferentemente, con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo, las soluciones de hematíes pueden ser reconcentradas.

65 Ventajosamente, el dispositivo y el procedimiento según la invención son fiables, fáciles a usar y permiten un fenotipaje de grupo sanguíneo directamente a partir de una muestra de sangre entera sin preparación previa. El dispositivo es fácilmente transportable y el usuario puede utilizar el procedimiento en cualquier lugar, sin equipo de medición ni equipo de centrifugación. Los ejemplos siguientes muestran un modo de realización posible del dispositivo según la invención, así como su utilización para dos pruebas complementarias de determinación de grupo sanguíneo: una prueba globular y una prueba sérica.

**Ejemplo 1: Modo de realización de un dispositivo según la invención**

Membrana porosa

5 La membrana porosa 3 es una membrana de polietileno de alta densidad que presenta un volumen de poros del 40 al 45%, un diámetro de poros medio de 7  $\mu\text{m}$ , y una porosidad distribuida entre 1 y 14  $\mu\text{m}$ .

10 Está delimitada en forma de discos de 6 mm de diámetro y de 1 mm de grosor.

Los discos son lavados con etanol puro con el fin de quitar todas las impurezas de bajo peso molecular y se ponen a secar en una estufa a 60°C.

Filtro

15 La membrana filtro 5 está constituida en particular por fibras de vidrio de diámetro de 1 a 7  $\mu\text{m}$ .

Está delimitada en forma de discos de 6 mm de diámetro.

20 Membrana absorbente

La membrana absorbente 2 es una membrana obtenida en Whatman con una capacidad de absorción de 198  $\text{mg}/\text{cm}^2$ .

25 Está delimitada en forma de discos de 6 mm de diámetro y un volumen de absorción equivalente a 50  $\mu\text{l}$  de sangre entera.

Soporte sólido

30 El soporte sólido 1 que permite acoger las diferentes membranas, es un soporte de plástico de 12 cm de longitud y 8 cm de anchura.

Está destinado a contener 72 zonas reactivas dispuestas en 8 columnas, comprendiendo cada zona un filtro 5, una membrana 3 y una membrana 2. Las columnas están destinadas a la identificación y a la determinación:

- 35
- de los antígenos A1 para la columna 1,
  - de los antígenos B para la columna 2,
  - de los antígenos AB para la columna 3,
  - de los antígenos D para la columna 5,
  - 40 - de los anticuerpos plasmáticos anti-A para la columna 6,
  - de los anticuerpos plasmáticos anti-B para la columna 7.

Las columnas 4 y 8 son unos controles positivos.

45 Reactivos anticuerpos

Los reactivos anticuerpos anti-A1, anti-B, anti-AB y anti-D son unos reactivos anticuerpos monoclonales purificados.

50 Están contenidos en una solución tampón PBS.

Después, se depositan en los discos de membrana 3 destinados a ser dispuestos a nivel de la columna 1 para anti-A1, de la columna 2 para anti-B, de la columna 3 para anti-AB y de la columna 5 para anti-D, y después se ponen a secar.

55 Se aplica una solución de lavado que contiene PBS tween sobre cada zona reactiva con el fin de eliminar los anticuerpos no unidos a la membrana 3,

Reactivos antiglobulinas

60 Los reactivos antiglobulinas son unos reactivos anticuerpos anti-fc purificados.

Los reactivos antiglobulinas son después depositados en los discos de membrana 3 destinados a ser dispuestos a nivel de la columna 6 y de la columna 7, después se ponen a secar.

65 Se aplica una solución de lavado que contiene PBS tween sobre cada zona reactiva con el fin de eliminar las antiglobulinas no unidas específicamente a la membrana 3.

Reactivos que aglutinan los glóbulos rojos

5 Se preparan unas aglutininas de soja a razón de 90 mg/l en tampón TRIS a pH 7.

Después, se depositan y se impregnan sobre el filtro 5 únicamente a nivel de la columna 6 y de la columna 7, y después se ponen a secar.

**Ejemplo 2: Realización del procedimiento para las columnas 1 a 5**

10 Se deposita una gota de sangre entera sobre cada zona reactiva.

Se espera entre 30 segundos y un minuto, después se aplica una solución de lavado para eluir los elementos de la sangre no unidos específicamente.

15 Cuando la muestra se deposita sobre las zonas reactivas de las columnas 1 a 5, todos los elementos de la sangre atraviesan el filtro 5 para llegar a nivel de la membrana porosa 3, ya que la membrana 5 está desprovista de reactivos de aglutinación de los glóbulos rojos. A nivel de la membrana porosa 3, si los glóbulos rojos de la muestra sanguínea llevan el antígeno que corresponde al anticuerpo presente en la zona reactiva, aparece una reacción de captación y de inmovilización de los glóbulos rojos que se traduce por una coloración roja de la zona reactiva. Cuando los glóbulos rojos no son reconocidos, son eluidos hacia la membrana tampón 2, lo cual se traduce visualmente por una ausencia de coloración de la zona reactiva.

**Ejemplo 3: Realización del procedimiento para las columnas 6 a 8**

25 Se deposita una gota de sangre entera sobre cada zona reactiva de las columnas 6 a 8.

Los glóbulos rojos se aglutinan a nivel del filtro 5 y una cierta cantidad de plasma atraviesa el filtro y llega a nivel de la membrana porosa 3 impregnada de antiglobulinas.

30 Unos hematíes de ensayo de antigenidades conocidos son después depositados sobre cada zona reactiva.

Se espera entre 30 segundos y un minuto, y después se aplica una solución de lavado para eluir los elementos de la sangre no unidos específicamente.

35 Cuando los anticuerpos plasmáticos de la muestra sanguínea reconocen los hematíes de ensayo correspondientes, estos últimos se fijan a nivel de la zona reactiva. El resultado se traduce por una coloración de la zona reactiva.

40 Cuando los anticuerpos plasmáticos inmovilizados no reconocen los hematíes de ensayo, estos últimos son eliminados por la solución de lavado hacia la membrana tampón 2.

45 Según otro modo de realización, los hematíes de ensayo son incorporados a la membrana porosa 3 y mantenidos húmedos por un dispositivo de protección contra la deshidratación. Cuando se aplica sangre entera a nivel de una zona reactiva, los anticuerpos plasmáticos circulantes que pasan a través del filtro 5 se inmovilizan sobre los antígenos membranarios correspondientes a nivel de la membrana 3 o son eluidos por la solución de lavado.

Ventajosamente, la invención permite realizar una prueba de Beth-Vincent y una prueba de Simonin en un mismo dispositivo sin equipo específico y sin modificación previa de la muestra de sangre.

50 Según un último aspecto, la invención se refiere también a un kit para la identificación y la determinación de antígenos eritrocitarios de grupos sanguíneos y de los anticuerpos plasmáticos correspondientes.

55 Este kit comprende por lo menos un dispositivo tal como el descrito anteriormente, permitiendo unos reactivos anticuerpos la determinación y la identificación de los antígenos eritrocitarios de los grupos sanguíneos, y de los hematíes de ensayo que permiten la determinación y la identificación de los anticuerpos plasmáticos circulantes.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Dispositivo para la identificación y la determinación de grupos sanguíneos a partir de una muestra de sangre entera, caracterizado por que comprende un soporte sólido (1) que comprende por lo menos una zona reactiva (4) sobre la cual se deposita la sangre y sobre la cual se lee el resultado, estando dicha zona reactiva constituida por lo menos por:
- 10 - una membrana porosa (3) de polímero de polietileno de alta densidad, que presenta unos poros de diámetro comprendido entre 1 y 20  $\mu\text{m}$ , impregnada por unos reactivos anticuerpos monoclonales o unos reactivos antiglobulinas que permiten la inmovilización de los anticuerpos plasmáticos, y
  - una membrana absorbente (2), destinada a recuperar el exceso de sangre de la muestra analizada.
- 15 2. Dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado por que por lo menos una zona reactiva (4) comprende también un filtro 5.
3. Dispositivo según la reivindicación 2, caracterizado por que el filtro (5) está constituido por fibras de vidrio de diámetro comprendido entre 1 y 7  $\mu\text{m}$ .
- 20 4. Dispositivo según la reivindicación 2 o 3, caracterizado por que el filtro (5) está impregnado por unos reactivos capaces de aglutinar los eritrocitos.
- 25 5. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende un depósito (6) que contiene una solución de lavado y/o de revelación.
- 30 6. Utilización del dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 5, para identificar y determinar unos grupos sanguíneos ABO, Rhesus y/o RAI a partir de una muestra de sangre entera.
- 35 7. Procedimiento de fenotipaje de grupos sanguíneos eritrocitarios, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- depositar una muestra de sangre entera en una zona reactiva (4) de un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 5,
  - 40 - dejar reaccionar durante por lo menos 30 segundos, y
  - aplicar una solución de lavado con el fin de eluir los elementos no unidos a la membrana porosa (3).
- 45 8. Procedimiento de fenotipaje de grupos ABO, Rhesus y/o RAI, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- depositar una muestra de sangre entera sobre una zona reactiva (4) de un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 5, cuya membrana porosa (3) ha sido impregnada por unos reactivos anticuerpos anti-antígenos específicos de los eritrocitos,
  - 50 - dejar reaccionar durante por lo menos 30 segundos, y
  - aplicar una solución de lavado con el fin de eluir los elementos no unidos a la membrana porosa (3).
- 55 9. Procedimiento de fenotipaje de grupos ABO, Rhesus y/o RAI, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- depositar una muestra de sangre entera sobre una zona reactiva (4) de un dispositivo según la reivindicación 4, cuya membrana porosa (3) ha sido impregnada por unos reactivos antiglobulinas que permiten la inmovilización de los anticuerpos plasmáticos circulantes,
  - 60 - depositar en dicha zona reactiva (4) unos hematíes de ensayo de antigenidades conocidos,
  - dejar actuar durante por lo menos 30 segundos, y
  - aplicar una solución de lavado con el fin de eluir los elementos no unidos a la membrana porosa (3).
- 65 10. Kit para la determinación y/o la detección de los grupos sanguíneos ABO, Rhesus y/o RAI a partir de una muestra de sangre entera, caracterizado por que comprende por lo menos:

5

- un dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 5,
- unos reactivos anticuerpos que permiten la determinación y la identificación de los antígenos eritrocitarios de los grupos sanguíneos, y
- unos hematíes de ensayo que permiten la determinación y la identificación de los anticuerpos plasmáticos circulantes.

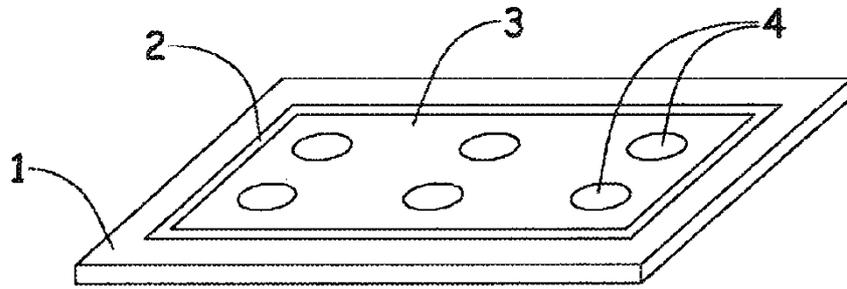


Fig.1

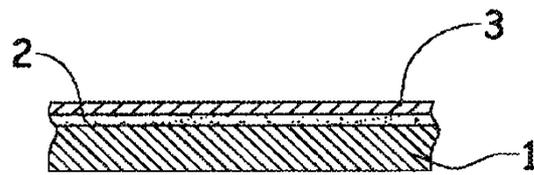


Fig.2A

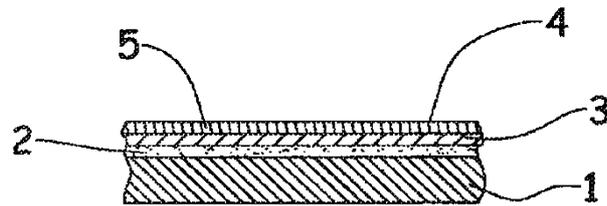


Fig.2B

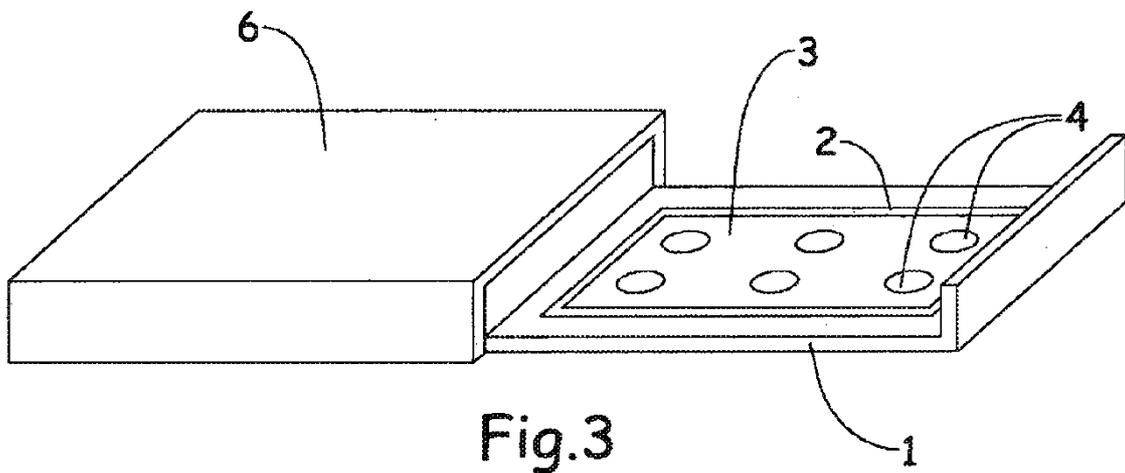


Fig.3