

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 043**

51 Int. Cl.:

G01N 33/80 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2011 PCT/EP2011/062560**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12010666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2011 E 11737928 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2596370**

54 Título: **Métodos de inmunodiagnóstico magnético y kits para la determinación de complejos de anticuerpo/antígeno en la agrupación y el fenotipado sanguíneo de eritrocitos**

30 Prioridad:

21.07.2010 FR 1055973
02.11.2010 US 409393 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2020

73 Titular/es:

DIAGAST (100.0%)
Eurasanté Parc, 251, avenue Eugène Avinée
59120 Loos, FR

72 Inventor/es:

FAUCONNIER, LAURENCE;
BARBREAU, YVES;
BOULET, ARNAUD y
ZAKHOUR, MAHA

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 779 043 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

Métodos de inmunodiagnóstico magnético y kits para la determinación de complejos de anticuerpo/antígeno en la agrupación y el fenotipado sanguíneo de eritrocitos

5

La presente invención se refiere a un método de inmunodiagnóstico magnético para la demostración de complejos de anticuerpo/antígeno. Un método de este tipo implica la investigación y/o identificación de anticuerpos o antígenos, preferentemente anticuerpos anti-antígeno o antígenos de un grupo sanguíneo. Este método implementa una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo anti-glicoforina A que puede reconocer y magnetizar específicamente eritrocitos. La invención asimismo incluye kits para llevar a cabo un método de este tipo.

10

Actualmente, la transfusión de sangre consiste en una inyección intravenosa de preparaciones de glóbulos rojos concentradas (concentrados globulares) obtenidas de un donante de sangre.

15

El principal riesgo de las transfusiones de sangre es la posibilidad de reunir un anticuerpo y su antígeno de eritrocitos en el cuerpo del receptor (la persona que recibe la transfusión). Los antígenos de membrana de eritrocitos, particularmente los antígenos de grupo sanguíneo (o sistema), se encuentran en la superficie de los eritrocitos, asimismo denominados glóbulos rojos, que son capaces de reconocerse por el sistema inmunitario y de desencadenar una respuesta inmunitaria y una hemólisis. Las consecuencias de una reacción inmunológica de este tipo pueden oscilar entre una transfusión ineficaz sin ningún signo clínico y una ligera reacción clínica (ansiedad, escalofríos), reacción clínica grave (choque, hemoglobinuria, insuficiencia renal) o reacción clínica drástica (choque, hemólisis intravascular diseminada) que da como resultado muerte.

20

Se dice que los glóbulos rojos del donante son compatibles con la sangre del receptor si el receptor no presenta anticuerpos circulantes dirigidos contra los antígenos eritrocitarios del donante. Entre todas las variantes antigénicas de un antígeno de membrana de eritrocitos que constituyen los grupos sanguíneos, se han identificado más de veinte sistemas de antígenos eritrocitarios en seres humanos hasta la fecha: el sistema ABO con los antígenos A, B y H antígenos, el sistema Rhesus con los antígenos D, E o e y C o c, el sistema Kell con los antígenos K o k, el sistema Duffy (Fya, Fyb), el sistema Kidd (Jka, Jkb), el sistema MNS u otros sistemas investigados menos frecuentemente en la práctica que asimismo existen tales como el sistema Lutheran, Lewis etc.

25

30

Los individuos con la misma combinación de antígenos eritrocitarios pertenecen al mismo grupo sanguíneo eritrocitario. Los grupos sanguíneos devienen incluso más complejos y numerosos cuando se utilizan varios sistemas de antígenos.

35

Excepto para estados patológicos, en el caso de una enfermedad autoinmunitaria por ejemplo, el suero de un individuo puede contener dos tipos de anticuerpos dirigidos contra antígenos eritrocitarios:

- a/ los denominados anticuerpos regulares dirigidos contra antígenos del sistema ABO (por ejemplo anticuerpos anti-A en individuos del grupo B). Estos son inmunoglobulinas de tipo IgM, capaces de aglutinar glóbulos rojos *in vitro*. Este fenómeno se utiliza para determinar el grupo ABO de un individuo por medio de las pruebas de Beth-Vincent y Simonin (pruebas de agrupación directa e inversa respectivamente). La prueba de Beth-Vincent hace posible determinar qué antígenos portan los glóbulos rojos (fenotipo de antígenos) y la prueba de Simonin hace posible llevar a cabo un estudio complementario, es decir detectar anticuerpos anti-A y y/o anti-B que circulan en el suero de un individuo.

40

45

En la prueba de Beth-Vincent, los glóbulos rojos de un individuo se ponen en contacto con sueros de prueba, o anticuerpos de prueba. Cada uno de ellos presenta una especificidad precisa, dirigida contra un antígeno del sistema ABO. Esta es por tanto una prueba de aglutinación de glóbulos rojos con sueros de prueba.

50

En la prueba de Simonin, asimismo denominada prueba inversa, el suero o plasma de un individuo, que contiene los anticuerpos circulantes de este último, se pone en contacto con glóbulos rojos de prueba, o eritrocitos de prueba. Cada uno de ellos pertenece a un grupo de antígenos específico del sistema ABO. Esta es por tanto una prueba de aglutinación sérica con glóbulos rojos de prueba,

55

- b/ los denominados anticuerpos irregulares (o inmunitarios) cuya presencia en el suero de plasma es opcional y que están dirigidos contra antígenos de sistemas distintos de ABO. Estos son lo más comúnmente anticuerpos de isotipo IgG, que aparecen cuando glóbulos rojos foráneos inducen estimulación antigénica. Ese es el caso por ejemplo tras la inmunización contra uno o más antígenos durante una transfusión de sangre, o incluso durante el embarazo debido a una reacción inmunitaria materna contra antígenos eritrocitarios fetales diferentes del grupo sanguíneo de la madre, particularmente durante el parto.

60

El examen de estos anticuerpos irregulares se denomina prueba de aglutinina irregular (IAT). Esta prueba se utiliza para detectar la presencia o ausencia de IgG dirigida contra diversos antígenos eritrocitarios, en la sangre de un individuo. Para esto, la prueba tiene como objetivo demostrar la unión de estos anticuerpos sobre glóbulos rojos de prueba, cuyos antígenos se conocen. Este método se lleva a cabo simultáneamente sobre muchos tipos de glóbulos rojos y la comparación de los resultados hace posible identificar la especificidad de la IgG presente.

65

El riesgo es mayor para los antígenos más inmunógenos, tales como rhesus D, pero asimismo para otros tipos de rhesus (E>c>e>C), el antígeno de sistema Kell (K), los antígenos del sistema Duffy (Fy a, Fy b), los antígenos del sistema Kidd (Jka, Jkb), etc.

5

En la práctica, no es posible tener en consideración todos estos antígenos cuando se lleva a cabo una transfusión, ya que la obtención del grupo sanguíneo correcto en el momento correcto no sería posible, especialmente ya que algunas combinaciones antigénicas son extremadamente poco comunes. Las transfusiones convencionales tienen en cuenta solo el grupo ABO más rhesus D (Rh+ o Rh-). En situaciones en las que existe un riesgo de una aglutinina irregular, se tienen en consideración varios otros sistemas, particularmente rhesus C y E y Kell, y a veces otros sistemas. Por tanto, para estas situaciones de riesgo, es importante garantizar la compatibilidad entre el grupo sanguíneo del donante y el grupo sanguíneo del receptor teniendo en cuenta la presencia o el riesgo de aparición de estas aglutininas irregulares.

10

15

Por tanto, en pacientes receptores con anticuerpos anti-eritrocitos irregulares o en una situación de riesgo, tales como pacientes que reciben múltiples transfusiones pero que no presentan anticuerpos irregulares anti-eritrocitos y en mujeres embarazadas, es de importancia seleccionar unidades de concentrado de eritrocitos que se transfunden de un modo tal que los glóbulos rojos del donante carezcan de antígenos contra los cuales se dirigen los anticuerpos del receptor o es probable que aparezcan.

20

Esta prueba de compatibilidad es obligatoria en estos pacientes y se utiliza preventivamente en todos los receptores antes de la administración de concentrados de eritrocitos por medio de una prueba de compatibilidad directa con los glóbulos rojos del donante en presencia de suero o plasma del receptor. No debe encontrarse ni reacción de aglutinación y/ni reacción de lisis en las técnicas utilizadas en IAT.

25

En la práctica de transfusión clínica, el fenotipo de eritrocitos, que corresponde a la investigación e identificación de los antígenos del grupo sanguíneo en la superficie de los glóbulos rojos (con la excepción del sistema ABO en el que asimismo se investiga la presencia de los anticuerpos regulares correspondientes), atañe a tanto el receptor como el donante.

30

Para el receptor y donante, existen tres niveles de fenotipo de eritrocitos con el fin de proporcionar al receptor concentrados de eritrocitos compatibles en función de las situaciones de riesgo:

- determinación del grupo ABO (o grupo ABO) y rhesus convencional (presencia o ausencia de antígeno D),
- determinación del fenotipo de Kell y rhesus (presencia o ausencia de antígeno C, E, c, e y K), y
- determinación de fenotipos extendidos (o más grandes) (presencia o ausencia de antígenos del sistema Duffy (Fya y Fyb), el sistema Kidd (Jka y Jkb) y del sistema MNSs (antígenos S y s), podrían investigarse posiblemente otros antígenos dependiendo del tipo de anticuerpos de riesgo y/o irregulares encontrados en el suero del receptor.

35

40

Las técnicas normalmente utilizadas para fenotipado consisten, en general, en examinar la presencia o ausencia del antígeno que está investigándose, utilizando sueros de prueba que contienen los anticuerpos apropiados. Preferentemente, estos anticuerpos contenidos en estos sueros de prueba presentan una naturaleza aglutinante (IgM o IgA), permitiendo de ese modo obtener una aglutinación total o parcial de los eritrocitos que van a fenotiparse cuando estos últimos portan el antígeno correspondiente al anticuerpo presente en el suero. No obstante, es posible utilizar anticuerpos de prueba no aglutinantes (de tipo IgG), en los que la aglutinación se desencadena por un anticuerpo anti-inmunoglobulina y se hace visible tras una etapa de centrifugación y resuspensión del residuo obtenido (conocida como técnica indirecta de Coombs). Asimismo es posible utilizar anticuerpos de prueba no aglutinantes en los que la presencia de estos anticuerpos de prueba unidos a los glóbulos rojos se visualiza por medio de un anticuerpo anti-inmunoglobulina unido a una fase sólida (técnica de inmunoadhesión). Los resultados se leen a simple vista o por medio de un dispositivo apropiado.

45

50

Para investigación o identificación, en una muestra del suero o plasma del paciente que va a someterse a prueba, de anticuerpos anti-antígenos de grupo sanguíneo, regulares para el ABO o irregulares para IAT, el suero o plasma del paciente se pone en contacto con eritrocitos (asimismo denominados glóbulos rojos o glóbulos rojos de prueba), de antigenicidad conocida para varios sistemas de grupo sanguíneo (ABO, Rhesus, Kell, Duffy, Kidd, MNSs, etc.).

55

En el caso de IAT, para la que los anticuerpos que es probable que estén presentes es más probable que sean no aglutinantes, la técnica utilizada es Coombs indirecta mediante aglutinación utilizando anticuerpo anti-inmunoglobulina o mediante inmunoadhesión a una fase sólida recubierta con un anticuerpo anti-inmunoglobulina.

60

Para IAT, una primera etapa implica la utilización de un panel de glóbulos rojos, esto se denomina examen (dos o tres glóbulos rojos de diferentes grupos seleccionados para incluir el número máximo de antígenos de importancia en la transfusión) y hace posible detectar (pero no identificar) la presencia o ausencia de anticuerpos irregulares. Cuando el examen es positivo, se lleva a cabo la identificación de la especificidad de los anticuerpos irregulares

65

por medio de un panel de glóbulos rojos, denominados glóbulos rojos de identificación, y que incluyen de 10 a 15 o incluso 20 glóbulos rojos fenotipados diferentes en la gran mayoría de sistemas de grupos sanguíneos conocidos.

5 En el caso de una prueba de compatibilidad (asimismo denominada prueba cruzada), los glóbulos rojos del donante que se originan a partir de bolsas de sangre que pueden transfundirse, se ponen en contacto con el suero o plasma del paciente. Habitualmente se realiza una etapa de centrifugación para observar la aglutinación debido a la presencia de anticuerpos en el suero del paciente y reactivos con glóbulos rojos del donante (incompatibilidad de ABO o anticuerpos irregulares de tipo IgM o IgA). Si esta primera etapa es negativa, le sigue una investigación de anticuerpos irregulares utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina (técnica de Coombs indirecta).

10 Existen numerosas variantes de las técnicas utilizadas para fenotipado o IAT en el campo de la transfusión de sangre. Estas técnicas pueden ser manuales, sobre una placa opalina, en un tubo o en un pocillo de microplaca, o en columna de gel o completamente automatizadas por medio de un robot para dispensar muestra y reactivo, agitador, incubador, centrífuga y lector automático, cuyos programas son adecuados para las técnicas implementadas.

15 Las técnicas utilizadas incluyen técnicas en las que la presencia anticuerpos anti-antígeno del grupo sanguíneo o antígenos del grupo sanguíneo se basa en la demostración de aglutinación de glóbulos rojos tras la centrifugación, utilizando una columna de minifiltración transparente (gel Sephadex® o microperlas) donde la abertura en el extremo superior actúa como cámara de incubación, y para la que el umbral de corte seleccionado para la columna impide que los glóbulos rojos aglutinados tras la centrifugación pasen a través de la columna (ver en particular la patente EP 0 194 212 o la patente EP 0 755 719).

20 Pueden citarse asimismo técnicas en las que el fenotipado o IAT se basa en la demostración de glóbulos rojos sensibilizados con un anticuerpo tras la centrifugación, seguido por inmunoadhesión utilizando una barrera de separación que consiste en un gel o líquido cuya densidad se selecciona de manera que solo los glóbulos rojos puedan cruzar esta barrera durante la centrifugación, estando recubierto el recipiente de reacción en la zona inferior con un anticuerpo anti-inmunoglobulina con el fin de atrapar glóbulos rojos sensibilizados y dar una imagen característica (documentos EP 0 058 780, WO 98/02752).

25 Entre las variantes de las técnicas utilizadas para fenotipado o IAT, asimismo pueden citarse las que se han desarrollado generalmente para investigar, en una muestra, un analito apto para unirse a una célula utilizando partículas magnéticas, esto en particular con el fin de eliminar la centrifugación, un proceso requerido en técnicas basadas en aglutinación tales como la técnica de antiglobulina (método indirecto de Coombs mediante aglutinación o inmunoadhesión a una fase sólida) para IAT o fenotipado. Este es asimismo el caso, como para IAT, cuando es necesario lavar glóbulos rojos sensibilizados con el fin de eliminar anticuerpos no específicos capaces de reconocer el anticuerpo anti-inmunoglobulina utilizado en la etapa posterior.

30 La etapa de centrifugación, de hecho, es siempre difícil de llevar a cabo en métodos que están completamente automatizados, particularmente debido al coste y la naturaleza engorrosa de las centrífugas, su manejo, etc.

35 Se han utilizado partículas magnéticas durante muchos años para la detección de complejos del tipo ligando-receptor o anticuerpo-antígeno. Pueden citarse los métodos descritos en los siguientes documentos de patente, WO 92/17781, EP 0 426 170, EP 0 351 857 EP, 0 528 708 o EP 0 230 768. La tecnología de magnetización de eritrocitos asimismo la dan a conocer Bouix *et al.* (Transfusion 2008, vol. 48, n.º 9, páginas 1878-1885), dicha tecnología asimismo se denomina QWALYS 2, implementada por el solicitante de la presente solicitud, Diagast. Se utilizan eritrocitos magnetizados en el método para la demostración de un complejo específico formado poniendo en contacto un anticuerpo anti-antígeno de la sangre, o fenotipo, y un antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo portado por un eritrocito dado a conocer en la solicitud de patente internacional WO 2007/051844. Estos eritrocitos magnetizados se preparan mediante la unión directa de eritrocitos a partículas paramagnéticas que presentan una superficie hidrófoba. Dichas partículas magnéticas hidrófobas se ponen en contacto con albúmina sérica bovina (BSA) para que se una a dichos eritrocitos con el fin de crear múltiples enlaces de intensidad leve entre la superficie del eritrocito y las partículas.

40 Por tanto, sería útil tener disponible un método rápido y sencillo para la detección de la presencia de un anticuerpo específicamente dirigido contra un antígeno dado en una mezcla de reacción compleja que contiene anticuerpos dirigidos contra otros antígenos, método en el que no hay ni una etapa de lavado ni una etapa de centrifugación. Un método de este tipo sin una etapa de centrifugación y sin una etapa de lavado, particularmente para IAT y para fenotipado, presenta la ventaja de poder utilizarse sobre un soporte práctico y disponible, tal como una microplaca, y de estar completamente automatizado.

45 Esto es precisamente el objeto de la invención.

50 La presente invención consiste en la mejora de la patente WO 2007/051844, porque combina la magnetización específica de los glóbulos rojos a través de perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo específico para un antígeno eritrocitario y un método de prueba sin etapa de lavado, utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina con el que se recubre el fondo de los pocillos de una microplaca. Esto es un denominado método de inmunoadherencia.

Este método combina una disolución viscosa, que sirve como filtro de barrera para el anticuerpo libre no unido a glóbulos rojos, y un diluyente depositado sobre la barrera de filtro que contiene perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo específico para un antígeno eritrocitario.

5

Por otro lado, la presente invención permite asimismo la magnetización de glóbulos rojos de un donante o paciente en pruebas de agrupación y fenotipado mediante el método de aglutinación directa. En estos casos, la magnetización de glóbulos rojos reemplaza a las etapas de centrifugación potenciando la aglutinación.

10

En todos los casos, durante la incubación de los glóbulos rojos con el suero del paciente o donante, o con las pruebas séricas (en el caso de agrupación o fenotipado), las células se magnetizarán mediante un anticuerpo específico. Esta magnetización puede magnetizar cualquier glóbulo rojo derivado de cualquier disolución o tampón y puede eliminar todos los elementos molestos presentes en el suero durante la magnetización.

15

El principio de la invención es magnetizar específicamente los glóbulos rojos para hacer que se muevan bajo la influencia de un campo magnético, y por tanto que sean capaces de realizar todas las etapas necesarias para implementar pruebas de inmunohematología.

20

La descripción se refiere al método de una magnetización específica de glóbulos rojos. Según la invención, el principio de magnetización de glóbulos rojos se utiliza en un kit las pruebas de agrupación de sangre, fenotipado, incluyendo la prueba de Simonin, pruebas de detección de anticuerpos en IAT, la prueba de compatibilidad entre donante y receptor, y en la prueba de antiglobulina directa.

25

La magnetización específica de glóbulos rojos consiste en la unión de partículas magnéticas a glóbulos rojos utilizando un anticuerpo específico monoclonal o policlonal para un antígeno de grupo sanguíneo expresado sobre la membrana de glóbulos rojos. Este anticuerpo específico para un antígeno de grupo sanguíneo está fijado covalentemente por sí mismo a partículas magnéticas funcionalizadas.

30

La elección del antígeno seleccionado como diana, reconocido por las perlas magnéticas acopladas al anticuerpo, se hizo sobre una proteína transmembrana altamente expresada en la superficie de glóbulos rojos humanos. Esta proteína transmembrana se expresa sin ninguna distinción étnica y no está presente en forma soluble en plasma humano. Por tanto, la proteína transmembrana elegida como antígeno seleccionado como diana es la glicoforina A.

35

La glicoforina A (GPA) es la sialoglicoproteína de glóbulos rojos más abundante y está presente sobre todos los glóbulos rojos de todos los grupos étnicos. No existe ninguna forma soluble de esta glicoproteína en el plasma humano. El número de copias de glicoforina A por glóbulo rojo se ha estimado en 1×10^6 .

40

La GPA consiste en una cadena polipeptídica de 131 aminoácidos (cadena madura), organizada en tres dominios: un dominio N-terminal extracelular de 72 aminoácidos, un dominio hidrófobo que comprende la membrana de 23 aminoácidos y un dominio citoplasmático C-terminal de 36 aminoácidos.

45

El dominio extracelular de esta glicoproteína contiene una alta proporción de residuos de serina y treonina y está fuertemente glicosilado con aproximadamente 15-O-glicanos y un único N-glicano.

50

Se sabe que la glicoforina A porta los antígenos M y N del sistema MNS. Estos dos antígenos difieren en un polimorfismo de nucleótido que conduce a un cambio en la cadena polipeptídica de dos aminoácidos: el primero en la posición 1 y el segundo en la posición 5 de la cadena polipeptídica. Esto induce un individuo positivo para antígeno M por la presencia de tanto una serina en la posición 1 como una glicina en la posición 5 en la cadena polipeptídica. Por otro lado, en un individuo que expresa el antígeno N estará presente un aminoácido leucina en la posición 1 y un ácido glutámico en la posición 5 de la cadena polipeptídica.

55

Estos dos antígenos están ubicados cerca del extremo N-terminal de la proteína de interés. Por tanto, el anticuerpo monoclonal utilizado debe presentar su epítipo de reconocimiento en la porción extracelular de la sialoglicoproteína pero asimismo a una distancia de los 2 antígenos M y N.

Secuencia de aminoácidos de la proteína GPA humana completa (código de una letra)

(número de registro de GenBank AAA88051)

**mygkiifvll lsaivsisas sttgvamhts tsssvtksyi ssqtdthkr dtyaatprah
evseisvrtv yppeeetger vqlahhfsep eitliifgvm agvigtilli sygirrikk
spsdvkplps pdtdvplssv eienpetsdq**

60

El fragmento AA 1-19 corresponde a la secuencia de péptido señal y el fragmento 20-150 (131 aminoácidos de

longitud, en negrita) a la cadena madura.

Un anticuerpo monoclonal que selecciona como diana específicamente GPA se da a conocer en la solicitud internacional WO 87/03096. Este anticuerpo (denominado KC-16) se une a microesferas magnéticas no porosas que se recubrieron previamente con anticuerpo de conejo o cabra anti-inmunoglobulina de ratón.

El anticuerpo monoclonal dirigido contra glicoforina A (anti-GPA), seleccionado para acoplarse a perlas magnéticas, es una inmunoglobulina murina de isotipo IgG. Este anticuerpo se desarrolló tras la inmunización de ratones con glóbulos rojos humanos A1. Se prefiere que estén dirigidos contra los aminoácidos 38-44 de glicoforina A (cadena madura, tal como se identificó anteriormente o variante natural de la misma).

Este anticuerpo monoclonal está por tanto acoplado covalentemente con perlas superparamagnéticas. De ese modo, el anticuerpo monoclonal anti-GPA, unido a perlas magnéticas, puede reconocer el antígeno sobre la superficie de eritrocitos y luego las células se magnetizan a través del anticuerpo anti-GPA.

Estos glóbulos rojos, sensibilizados mediante las partículas magnéticas acopladas con un anticuerpo anti-eritrocitos, se ven atraídas por un campo magnético así como asimismo presentan antígenos sanguíneos (grupo y fenotipo) sobre su superficie. Entonces podrían utilizarse como soporte reactivo y vector de movimiento para el complejo de antígeno-anticuerpo en una prueba de análisis inmunológico (figura 1).

Se conocen ya otros métodos que permiten la magnetización de los glóbulos rojos de un paciente por medio de partículas ferromagnéticas.

La patente WO 2005/121805 describe la utilización de partículas ferromagnéticas de tamaño muy pequeño para la magnetización de glóbulos rojos y su utilización en pruebas de agrupación y fenotipado y para la detección de anticuerpos irregulares (pruebas de IAT). La magnetización de glóbulos rojos se hace de un modo no específico por medio de un contacto directo entre los glóbulos rojos y las partículas ferromagnéticas. Un método de este tipo permite desplazar los glóbulos rojos del paciente bajo la influencia de un campo magnético.

El documento de patente EP 0 230 768 asimismo describe un método de coagregación para partículas magnéticas capaces de unirse a una sustancia contenida en una muestra por medio de compuestos policatiónicos y polianiónicos en presencia de un campo magnético. En particular, este documento describe la separación de plasma en una muestra de sangre completa que contiene glóbulos rojos en la que el método implica la adición secuencial a un recipiente colocado sobre un imán de la muestra de sangre completa y un ferrofluido ($\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$) recubierto con albúmina sérica bovina succinilada, los agregados de las partículas de eritrocitos obtenidos de este modo son atraídas entonces hacia el imán, haciendo por tanto posible recoger el plasma clarificado por decantación.

La patente WO 02/46758 describe un método para la magnetización de glóbulos rojos por medio de partículas magnéticas activadas de antemano mediante albúmina sérica bovina de modo que se crean numerosas interacciones no específicas y de baja intensidad entre la superficie de los glóbulos rojos y las partículas.

Estas técnicas utilizando perlas magnéticas o ferrofluidos modificados para magnetizar glóbulos rojos permiten eliminar las etapas de centrifugación. No obstante, presentan la desventaja de implementar interacciones no específicas entre las partículas magnéticas y los glóbulos rojos, pero asimismo interacciones no específicas entre estas partículas magnéticas y todos los elementos presentes en la disolución biológica. Estas interacciones no específicas entre partículas magnéticas y glóbulos rojos pueden modificarse mediante cualquier otro elemento presente y notablemente mediante los elementos plasmáticos del paciente que van a someterse a prueba cuando hay un contacto entre las partículas magnéticas y los eritrocitos.

La presente invención presenta la ventaja de unir específicamente las perlas magnéticas sobre los glóbulos rojos por medio del reconocimiento específico de un antígeno exclusivamente presente en la superficie de estos eritrocitos. Este método permite magnetizar los glóbulos rojos en cualquier condición, sin verse dificultado por los elementos proteicos y/o glucídicos presentes en el medio durante la reacción de magnetización.

Se conocen ya muchos métodos de magnetización en los que se unen partículas magnéticas a marcadores por medio de interacciones covalentes o específicas.

Actualmente, sistemas de diagnóstico muy numerosos se basan en la utilización de partículas magnéticas funcionalizadas. Se utilizan o bien para la investigación de anticuerpos presentes en el medio biológico o bien para la investigación de estructuras antigénicas que inducen una respuesta inmunitaria del huésped.

Este es el caso para los sistemas de ELISA, por ejemplo. En tales sistemas, las perlas magnéticas funcionalizadas se acoplan de hecho con antígenos o anticuerpos y se utilizan como soporte reactivo para la detección de analitos en plasma. Los soportes magnéticos permiten llevar a cabo etapas de lavado al tiempo que eliminan las etapas de centrifugación.

5 O asimismo, las perlas acopladas a anticuerpos se utilizan para clasificar una población celular que expresa el antígeno CD4 en una muestra de sangre humana; puede ser posible unir específicamente una ferropartícula magnética sobre la superficie de células positivas para CD4 por medio de un anticuerpo apropiado. Entonces la sangre completa se somete a un campo magnético para aislar la población de células que interacciona con las partículas magnéticas.

10 Como para la presente invención, los eritrocitos magnetizados (asimismo denominados glóbulos rojos magnetizados) se utilizan como soporte para la detección de anticuerpos irregulares (IAT), para pruebas cruzadas o para prueba de antiglobulina directa (DAT). Ha de indicarse que este proceso de magnetización ni enmascara los antígenos presentes en la superficie del glóbulo rojo, ni interfiere con la detección de anticuerpos irregulares dirigidos contra antígenos eritrocitarios.

15 La presente descripción da a conocer la magnetización de los glóbulos rojos de un modo específico y la presente invención consiste en utilizar directamente esas perlas específicas en el medio reactivo.

Por ejemplo, para la prueba de detección de anticuerpos irregulares, pueden utilizarse varios enfoques para llevar a cabo esta prueba por medio de perlas acopladas con anti-glicoforina A (anti-GPA).

20 Se da a conocer un método para la magnetización de eritrocitos, en el que consiste en las siguientes etapas:

- a) el acoplamiento de anticuerpo anti-GPA en la superficie de las partículas magnéticas, y,
- 25 b) el contacto de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA obtenido en la etapa a) con eritrocitos.

30 Preferentemente, el acoplamiento del anticuerpo se realiza mediante adsorción pasiva, mediante acoplamiento covalente, o mediante enlaces de hidrógeno iónicos, o mediante acoplamiento de tipo ligando/receptor (por ejemplo avidina-estreptavidina), esto según la naturaleza y funcionalización de las partículas magnéticas utilizadas.

Las técnicas de inmunodiagnóstico, para captura o para clasificación celular, que implican partículas magnéticas, han sido el sujeto de muchas publicaciones y las conoce bien el experto en la materia.

35 Entre estas técnicas, pueden citarse las que utilizan una funcionalización de una partícula magnética, haciendo por tanto posible obtener un grupo reactivo en la superficie capaz de hacer reaccionar, en condiciones apropiadas y con los reactivos adecuados, con los antígenos que van a injertarse covalentemente en la partícula, particularmente un grupo ácido, grupo amina, grupo epoxi o aldehído por citar los más comunes.

40 Pueden citarse asimismo las técnicas que hacen utilización de adsorción pasiva del antígeno que va a unirse a la partícula, particularmente mediante tratamiento adecuado que permita conseguir perlas cargadas positiva o negativamente, dependiendo del antígeno y las condiciones en la que esta adsorción pasiva tiene que llevarse a cabo.

45 Preferentemente todavía, el anticuerpo anti-GPA es un anticuerpo de mamífero, preferentemente de origen murino o humano, y apto para reconocer específicamente la glicoforina A expresada por eritrocitos, preferentemente dirigidos contra la sialoglicoproteína glicoforina A, preferentemente de nuevo contra su dominio extramembranoso.

50 Todavía más preferentemente, un anticuerpo monoclonal anti-GPA dirigido contra un epítipo de la parte extracelular de la sialoglicoproteína glicoforina A, no llevando dicho epítipo ni parte ni la totalidad del antígeno M o N, particularmente no conteniendo dicho epítipo el fragmento de aminoácidos de 1-5 de la parte N-terminal de la glicoforina A.

55 Preferentemente, dicho método de magnetización de eritrocitos se caracteriza por que comprende además una etapa en la que la suspensión de eritrocitos "magnetizados" obtenidos en la etapa b) se diluye en un diluyente que contiene un detergente no iónico tal como se define en el método a continuación, siendo dicho diluyente preferentemente un diluyente de baja fuerza iónica que contiene un polímero hidrófilo tal como se define asimismo a continuación.

60 La presente invención se refiere a un método para la demostración de un complejo específico formado haciendo reaccionar un anticuerpo anti-antígeno, procedente de grupo o fenotipo sanguíneo, que está presente en una disolución y un antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo y que se expresa por un eritrocito, dicho eritrocito unido a una partícula magnética, teniendo lugar la reacción en un reactor con una parte superior abierta y una base sellada cuyo diámetro disminuye por lo menos en la zona próxima a la base de tal manera que forma una pared inclinada que está por lo menos parcialmente recubierta con un anticuerpo anti-inmunoglobulina o con cualquier otro compuesto apto para unirse al anticuerpo de dicho complejo formado, consistiendo dicho método en varias etapas:

65

- a) antes del contacto entre la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y la disolución que contiene probablemente anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo:

5 llenar el reactor con una disolución viscosa de manera que cubra por lo menos parte de la pared inclinada del reactor,

10 b) poner en contacto la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo con la suspensión de partículas magnéticas que portan o es probable que porten dicho antígeno en un punto por encima de la disolución viscosa en el reactor,

15 c) incubar el reactor durante un tiempo dado requerido para la formación del complejo entre las partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo que es probable que estén contenidos en la disolución y para reconocer específicamente dichos antígenos de grupo o fenotipo sanguíneo portados por los eritrocitos;

20 d) aplicar un campo magnético a dicho reactor y agitar este reactor, de manera que las partículas magnéticas son atraídas hacia la parte inferior y/o la pared inclinada del reactor; y

25 e) leer a simple vista y/o mediante cualquier otro sistema de lectura adecuado la imagen obtenida en el fondo del reactor y/o la pared inclinada del reactor recubierta con dicho anticuerpo anti-inmunoglobulina o con cualquier otro compuesto apto para unirse al anticuerpo, haciendo posible la imagen obtenida demostrar la presencia o no de un complejo específico anticuerpo/anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo, caracterizado por que dichas partículas magnéticas que llevan los eritrocitos son partículas magnéticas que se han recubierto previamente con un anticuerpo anti-glicoforina A (anti-GPA) y asimismo por que dicho eritrocito está unido a dicha partícula magnética mediante una interacción de anticuerpo/antígeno.

30 En general, el anticuerpo del complejo específico anticuerpo/antígeno puede ser de naturaleza IgG, IgM, IgA o IgE o de cualquier otra clase de anticuerpos.

35 El término "anticuerpo anti-inmunoglobulina apto para unirse al anticuerpo de dicho complejo formado" se refiere en la presente memoria a anticuerpos anti-inmunoglobulinas, policlonales o monoclonales, capaces de reconocer y unirse a cualquier anticuerpo, particularmente humano, ya sea IgG, IgM, IgA o IgE (anticuerpo anti-inmunoglobulina total), o determinadas categorías específicas de anticuerpo, particularmente anticuerpos anti-IgG específicos. Tales anticuerpos anti-inmunoglobulinas, particularmente humanos, los conoce bien el experto en la materia y están disponibles de muchos proveedores y por tanto no se describirán en detalle en la presente memoria, especialmente en cuando a sus procesos de fabricación.

40 Todavía preferentemente, cuando este anticuerpo es del tipo IgG, un anticuerpo anti-IgG es el anticuerpo anti-inmunoglobulina preferido, particularmente anticuerpo anti-IgG humano (dirigido contra anticuerpos de origen humano).

45 Todavía preferentemente, cuando este anticuerpo es del tipo IgG o IgM, se prefiere una combinación de anticuerpo anti-IgG y anti-IgM; particularmente de origen humano.

El término "cualquier otro compuesto apto para unirse al anticuerpo de dicho complejo formado" se refiere en particular a compuestos de tipo proteína A o compuestos de tipo proteína G, bien conocidos por el experto en la materia, para el reconocimiento y la unión específica de anticuerpos.

50 En una forma de realización preferida, la presente invención incluye un método según la invención, caracterizado por que el método utilizado para magnetizar los eritrocitos es el proceso de magnetización de eritrocitos tal como se describió anteriormente.

55 En una forma de realización preferida, la presente invención incluye un método según la invención, caracterizado por que antes de poner en contacto la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos con la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo, dicha suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos está en suspensión en un diluyente cuya densidad es superior a 1 e inferior a la densidad de dicha disolución viscosa.

60 En una forma de realización igualmente preferida, dicho procedimiento según la presente invención se caracteriza por que dichas etapas a) y b) son las siguientes:

65 a) antes de poner en contacto la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo:

i) preparar la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos fuera de dicho reactor,

ii) llenar el reactor con una sustancia viscosa de manera que se cubra por lo menos parcialmente la pared inclinada del reactor, luego con dicho diluyente;

5 b) poner en contacto por encima del diluyente la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos preparada durante la etapa a)i) y la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo.

En otra forma de realización preferida, dicho procedimiento según la presente invención se caracteriza porque dichas etapas a) y b) son las siguientes:

10 a) antes del contacto de la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo:

15 - llenar el reactor con una sustancia viscosa de manera que se cubra por lo menos parcialmente la pared inclinada del reactor, luego con dicho diluyente, luego con la suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA, luego con la suspensión de eritrocitos;

20 b) poner en contacto en el reactor la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo y la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos formada o en formación.

En otra forma de realización preferida, dicho procedimiento según la presente invención se caracteriza porque dichas etapas a) y b) son las siguientes:

25 a) antes del contacto de la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo:

30 i) preparar fuera de dicho reactor una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA, estando dichas partículas magnéticas en suspensión en dicho diluyente, o la disponibilidad de una suspensión de este tipo ya preparada,

ii) llenar el reactor con una sustancia viscosa de manera que se cubra por lo menos parcialmente la pared inclinada del reactor, luego con la suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA en dicho diluyente preparado en la etapa a)i), luego con la suspensión de eritrocitos;

35 b) poner en contacto en el reactor la disolución que contiene o es probable que contenga dichos anticuerpos y la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos formada o en formación.

En esta última forma de realización preferida, dicho procedimiento según la presente invención se caracteriza porque:

40 a) al final de la etapa a)i), se establece un contacto entre dicha suspensión que contiene las partículas magnéticas en suspensión en dicho diluyente con la suspensión de eritrocitos fuera del reactor para formar una suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos en suspensión en dicho diluyente; y

45 en la etapa a)ii) llenar el reactor con una sustancia viscosa de manera que se cubra por lo menos parcialmente la pared inclinada del reactor, luego con dicha suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos en suspensión en dicho diluyente;

50 b) poner en contacto en el reactor la disolución que contiene o es probable que contenga dichos anticuerpos y la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos.

En otra forma de realización particularmente preferida, la presente invención incluye un método según la invención, caracterizado por que en el contexto de automatización, la dispensación de los reactivos mediante un autómata de laboratorio, dichas etapas a) y b) son las siguientes:

55 a) poner en contacto la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y la disolución que contiene o es probable que contenga el anticuerpo anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo:

60 i) preparar fuera de dicho reactor una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA, estando dichas partículas magnéticas en suspensión en dicho diluyente, o la disponibilidad de una suspensión de este tipo ya preparada,

65 ii) llenar el reactor con la suspensión de eritrocitos, luego con una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA en dicho diluyente preparado en la etapa a)i), luego si es necesario tras agitación, con dicha sustancia viscosa de manera que se cubra por lo menos parcialmente la pared inclinada del reactor, inyectándose dicha sustancia viscosa en el fondo del reactor;

b) poner en contacto en el reactor la disolución que contiene o es probable que contenga dichos anticuerpos y la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos formada o en formación.

5 En una forma de realización preferida, la presente invención incluye un método según la invención, caracterizado por que en la etapa d), la aplicación de un campo magnético a dicho reactor y la agitación del reactor se llevan a cabo simultáneamente (ver las figuras 1A y 1B como ejemplo del dispositivo que realiza estas etapas diferentes).

10 En una forma de realización preferida, la presente invención incluye un método según la invención, caracterizado por que en la etapa d) la aplicación del campo magnético a dicho reactor y la agitación del reactor se llevan a cabo simultáneamente (ver las figuras 1A y 1B como ejemplo del dispositivo que permite realizar estas etapas diferentes).

15 El término "simultáneamente" se refiere en la presente memoria a un periodo de tiempo que no excede más de 20 s, donde solo se lleva a cabo la agitación o la aplicación del campo magnético.

Asimismo se describe que en la etapa d) la aplicación del campo magnético y la agitación se llevan a cabo simultáneamente durante un periodo de entre 2.5 min y 10 min, preferentemente durante un periodo de entre 5 min y 6 min.

20 Además, en la etapa d) la aplicación del campo magnético se produce mediante un imán ubicado fuera del reactor de tal modo que las partículas magnéticas son atraídas en el fondo del reactor.

Además, en la etapa d) la agitación consiste en agitación rotatoria.

25 Asimismo se describe que en la etapa d) la agitación se lleva a cabo a una velocidad de entre 250 y 750 rpm, preferentemente a 600 rpm.

Según la descripción, en la etapa c), el periodo de incubación es de entre 10 min y 30 min a una temperatura de entre 20°C y 40°C, preferentemente a una temperatura de 37°C ± 1°C.

30 Además, en esa etapa d), la agitación del reactor se realiza en presencia del campo magnético.

35 En la etapa d), la etapa de aplicación del campo magnético y la etapa de agitación del reactor pueden llevarse a cabo comenzando con una u otra de las etapas pero de tal manera que la aplicación del campo magnético y la agitación tienen lugar simultáneamente durante por lo menos un periodo de tiempo dado.

40 Asimismo se describe una variación en la presente memoria, en la que la aplicación del campo magnético se lleva a cabo antes de agitar el reactor en la etapa d) del método, no excediendo la aplicación del campo magnético solo (sin agitar) un periodo de dos minutos como máximo, preferentemente un minuto 30 s, un minuto o 30 s. Este es asimismo el caso cuando la agitación se lleva a cabo antes de la aplicación del campo magnético, mediante lo cual el periodo de agitación solo no excede una duración de 2 minutos como máximo, preferentemente 1 minuto 30 s como máximo, 1 min o 30 s.

45 En la etapa d), la aplicación del campo magnético se lleva a cabo por medio de un imán ubicado externamente por debajo del reactor de manera que las partículas magnéticas son atraídas hacia la base del reactor, preferentemente a lo largo del eje longitudinal del reactor.

50 Además, en la etapa d) dicho imán es un imán permanente de una magnitud que está comprendida entre 8000 y 16000 Gauss, preferentemente entre 10000 y 14000 Gauss, más preferentemente todavía entre 11500 y 12500 Gauss, siendo una magnitud de 12000 Gauss la más preferida.

En otra variante, en la etapa d) la agitación se lleva a cabo por medio de un agitador rotatorio.

55 El término "agitador rotatorio" se refiere en la presente memoria en particular a una plataforma rotatoria con un reactor fusionado, o conjunto de reactores en el caso de una microplaca de 96 cúpulas (se hace referencia a las figuras 1A y 1B).

60 En un modo de agitación particular, en la etapa d), la agitación consiste en una agitación rotatoria que presenta una órbita en una proporción entre 1.0 mm y 2.5 mm de diámetro, preferentemente entre 1.25 y 2.25 mm, entre 1.5 mm y 2 mm de diámetro, siendo 2 mm el diámetro de órbita preferido cuando el reactor presenta un diámetro de 7 mm en su punto más ancho.

65 El término "proporción" significa que, por ejemplo cuando el diámetro de la sección más ancha es el doble o la mitad de 7 mm, el diámetro correspondiente de la órbita de rotación mencionada se doblará o dividirá entre dos.

El término "órbita para agitación de tipo rotatoria" se refiere al diámetro del círculo descrito por el punto más bajo

del reactor en el transcurso del proceso de agitación (el punto más bajo del eje central longitudinal del reactor).

Además, en la etapa d), la agitación se lleva a cabo a una velocidad de entre 250 y 750 rpm, preferentemente entre 400 y 600 rpm.

5 El imán ubicado entre cada uno de los reactores forma parte de la plataforma de agitación (ver asimismo las figuras 1A y 1B).

10 En el último caso, el eje central longitudinal del imán ubicado bajo el reactor sigue la órbita formada por el eje central longitudinal del reactor durante la agitación.

15 El imán ubicado bajo cada uno de los reactores no está fijado a la plataforma de agitación. En este caso, el eje central longitudinal del imán ubicado bajo el reactor no se mueve y no sigue la órbita formada por el eje central longitudinal del reactor durante la agitación.

La presente invención incluye un método según la invención en el que en la etapa c), la duración de la incubación es de entre 10 minutos y 30 minutos, preferentemente entre 15 y 25 minutos.

20 Se describe que, en la etapa c), la incubación se lleva a cabo a una temperatura de entre 10°C y 40°C, preferentemente entre 25°C y 40°C, entre 30°C y 40°C, preferentemente de aproximadamente 37°C (37°C ± 1°C).

Se describe que en la etapa b), la incubación se lleva a cabo a una temperatura de entre 30°C y 40°C, preferentemente a 37°C.

25 Tal como se describe en la presente memoria las partículas magnéticas presentan un diámetro de entre 100 nm y 3.0 μm, preferentemente entre 200 nm y 1.5 μm, preferentemente funcionalizadas por un grupo tosilo, un grupo carboxilo, un grupo amina o incluso un grupo alcohol.

30 Además, dichas partículas magnéticas contienen por lo menos el 40% en peso de compuestos ferromagnéticos, preferentemente entre el 40% y el 50%.

35 En la etapa a), el llenado preliminar del reactor con una sustancia viscosa o un gel homogéneo se realiza con una sustancia viscosa cuya densidad es tal que impide la migración de anticuerpos que no forman complejos con los antígenos unidos a las partículas magnéticas hacia la pared inclinada y el fondo del reactor recubierto con anticuerpo anti-inmunoglobulina u otro compuesto apto para reconocer el anticuerpo en la etapa d).

Dicha disolución viscosa presenta una densidad mayor de 1.

40 Más preferentemente, dicha disolución viscosa se selecciona de los geles, preferentemente seleccionados de geles derivados de perlas Sephadex™ y Sepharose™ de dextrano cuyo diámetro puede variar de desde 20 nm hasta 300 nm, preferentemente G-100™ o Sepharose™ 4B o 6B superfina, entre la PVP (polivinilpirrolidona), PVP-40 o PVP-60 o disoluciones de albúmina del 30% ± 10% o incluso gelatina.

45 En la presente memoria, en la primera etapa, el gel es dextrano o agarosa (Sepharose™ (Pharmacia, Suecia), concretamente Sepharose™ 4B o 6B).

Además, cuando dicha disolución es del tipo gel, este gel se prepara en presencia de albúmina sérica bovina con el fin de aumentar la densidad de la disolución de gel, preferentemente hasta concentraciones finales en la disolución de gel del 5% al 15% p/v, preferentemente el 10% ± 2.5%.

50 Se describe asimismo que, en la primera etapa, la disolución viscosa o gel es Sephadex™, (Pharmacia, Suecia, o Sigma-Aldrich), preferentemente G-10™, G-25™, G-50™, G-75™, G-100™, G-150™ o G-200™, donde el diámetro de las perlas de dextrano pueden oscilar entre 20 nm y 300 nm. Más preferentemente, Sephadex™ es G-100™ superfino.

55 Incluso más preferentemente, la concentración de gel, particularmente la de Sephadex™ o Sepharose™, es de entre el 1.5% y el 6%, preferentemente entre el 2% y el 5%, entre el 2.5% y el 4%. Una concentración del 3% ± 0.5% en p/v es lo más preferido, particularmente para Sephadex™, en particular para G-100™ superfino.

60 Se describe además que, en la segunda etapa, dicha disolución que contiene o que es probable que contenga las perlas acopladas con anticuerpo anti-glicoforina A se deposita sobre la disolución viscosa antes de depositar la suspensión de eritrocitos que portan o es probable que porten dicho antígeno.

65 Además, en la etapa b), la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo se deposita antes de la suspensión de eritrocitos cuando esta última se deposita después de la disolución viscosa y después de dicho

diluyente.

Según la descripción, el diluyente presenta una densidad inferior a la densidad de la disolución viscosa y superior a la densidad de la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo.

5 Además, el diluyente es una disolución que comprende un polímero hidrófilo a una concentración que permite ajustar su densidad a una densidad entre la del plasma o el suero y la de dicha disolución viscosa.

10 Asimismo se describe que el diluyente es una disolución que contiene un polímero polisacárido hidrófilo, preferentemente Ficol™, particularmente Ficoll™ 400, con un intervalo de concentración de desde el 1% hasta el 2.5% (p/v), en preferencia el 2% ± 0.3%.

15 En otra forma de realización preferida, la presente invención, se caracteriza por que el reactor es una cúpula de microplaca con un fondo en forma redonda o en forma de V.

20 Tal como se describe en la presente memoria, la disolución de anticuerpo es una muestra de suero o plasma humano en el que el objetivo es detectar la presencia de un anticuerpo dirigido específicamente contra un antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo, y en el que el anticuerpo anti-inmunoglobulina es un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana (HAG).

25 En una forma de realización particularmente preferida, el método de la presente invención es un método para la detección e identificación de anticuerpos irregulares (IAT) en una muestra de suero o plasma, caracterizado por que comprende una etapa en la que los eritrocitos portados por las perlas magnéticas son eritrocitos del grupo O.

30 En otro aspecto, la presente invención incluye un método para la agrupación y/o el fenotipado de sangre caracterizado por que comprende el método de la presente invención y en el que la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo humano es una prueba sérica que contiene anticuerpo de especificidad de grupo/fenotipo sanguíneo conocida.

35 En el caso del método de aglutinación directa, la presente invención permite tanto el tipado del grupo como el fenotipo de todos los antígenos presentes en la superficie de glóbulos rojos tan pronto como se encuentre un anticuerpo disponible.

40 Por tanto los siguientes antígenos pueden identificarse mediante la presente invención, los del sistema ABO, (antígeno A, antígeno B, antígenos A y B expresados simultáneamente, el antígeno H), los antígenos del sistema Rhesus (antígenos D, C, c, E, e o Cw), los antígenos del sistema Kell (K o k), los antígenos del sistema Duffy (Fya y Fyb), los antígenos del sistema Kidd (Jka y Jkb), los antígenos del sistema MNS (M, N, S y s) o asimismo de otros antígenos que se investigan menos comúnmente pero que asimismo existen, tales como los del sistema Lewis sistema, el sistema Lutheran, etc.

45 Para la agrupación y/o el fenotipo, pueden utilizarse pruebas séricas, incluyendo anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales o recombinantes, de especificidades conocidas capaces de reconocer y de unirse al antígeno en el eritrocito contra el que se dirige.

50 Los anticuerpos de prueba anti-antígeno de grupo sanguíneo podrían estar en disolución líquida o en forma secada en una microplaca.

Si los anticuerpos presentes en las pruebas séricas son del tipo IgM, la prueba implantada será una reacción de aglutinación sin la utilización de un anticuerpo anti-inmunoglobulina (véanse los ejemplos 9-11).

55 En este caso, las perlas magnéticas acopladas al anticuerpo anti-GPA se incubarán con los glóbulos rojos que van a fenotiparse e igual que los antisueros.

En otros casos, cuando las pruebas séricas son del tipo IgG, es posible realizar un reactivo que contiene un anticuerpo anti-inmunoglobulina anti-IgG saturado con IgG anti-eritrocito de interés. En este caso el anticuerpo anti-IgG puede aglutinarse y dar como resultado una reacción de aglutinación (véase el ejemplo: fenotipado de sangre con anticuerpos de IgG y/o IgM en forma líquida).

60 La presente invención se refiere por tanto a un método para la agrupación y/o el fenotipado de sangre caracterizado por que dicho método comprende las etapas de:

a) preparar una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA, estando dichas partículas magnéticas en suspensión en un diluyente, o la disponibilidad de una suspensión de este tipo ya preparada,

65 b)

- 5
- i) poner en contacto la suspensión de dichas partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA con una suspensión de eritrocitos para los que se desea determinar el fenotipo y/o grupo sanguíneo,
- ii) poner en contacto en un reactor la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos formada o en formación en la etapa b) con una prueba sérica que contiene anticuerpo de especificidad conocida,
- 10
- iii) agitar o remover
- c) incubar el reactor durante un tiempo dado necesario para la formación del complejo entre las partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y la prueba sérica;
- 15
- d) aplicar un campo magnético a dicho reactor y agitar el reactor, de manera que las partículas magnéticas son atraídas hacia el fondo y/o la pared inclinada del reactor; y
- e) leer a simple vista y/o con cualquier otro sistema de lectura apropiado la imagen obtenida en el fondo del reactor y/o sobre la pared inclinada del reactor, haciendo posible esta imagen obtenida demostrar la presencia o no de la formación de un complejo específico anticuerpo/antígeno de grupo o fenotipo humano.
- 20

En una forma de realización preferida, la presente invención incluye un método según la invención en el que:

- 25
- en la etapa d), se aplica un campo magnético a dicho reactor con una etapa de agitación, de manera que las partículas magnéticas son atraídas hacia el fondo del reactor; y
 - en la etapa e), la lectura a simple vista y/o con cualquier otro sistema de lectura apropiado de una reacción de aglutinación obtenida o no en el fondo del reactor, demostrando esta aglutinación específica la presencia de la formación de un complejo específico anticuerpo/antígeno de grupo o fenotipo humano.

30 En la etapa b) ii) dicha prueba sérica está en disolución o en forma secada.

Se describe que las partículas magnéticas presentan un diámetro de entre 100 nm y 3,0 μm , preferentemente entre 200 nm y 1,5 μm .

35 Dichas partículas magnéticas contienen además por lo menos el 40% en peso de compuestos ferromagnéticos.

Se describe que en la etapa d), la aplicación de un campo magnético se lleva a cabo por medio de un imán ubicado externamente por debajo del reactor de manera que las partículas magnéticas son atraídas hacia el fondo del reactor.

40 En esa etapa d) dicho imán es un imán permanente de magnitud que está comprendida entre 10,000 y 14,000 Gauss.

Además, en la etapa b) iii) o/y d), la agitación se lleva a cabo por medio de un agitador rotatorio.

45 Además, en la etapa d), la aplicación de un campo magnético a dicho reactor y la agitación del reactor se llevan a cabo simultáneamente.

50 Asimismo se describe que, en la etapa b) iii), la aplicación de la agitación ("agitation") (o remover ("stirring")) se lleva a cabo durante un periodo de 5 s a 3 min, preferentemente durante un periodo de 1 min a 2 min.

Además, en la etapa b) iii), la agitación se lleva a cabo a una velocidad que está comprendida entre 1000 y 1200 rpm, preferentemente a 1200 rpm entre 10 s.

55 Se describe que, en la etapa d), la agitación se lleva a cabo a una velocidad que está comprendida entre 500 y 800 rpm, preferentemente entre 650 y 750 rpm, preferentemente a 700 rpm.

Además, en la etapa c), la duración de la incubación está comprendida entre 2 min y 30 min, preferentemente entre 8 y 20 min, más preferentemente a una temperatura entre 20°C y 40°C, preferentemente a temperatura ambiente o 37°C.

60 En la etapa d), la duración de la magnetización está comprendida entre 2 min 30 y 7 min, preferentemente 5 min, más preferentemente a una temperatura entre 20°C y 40°C, preferentemente a temperatura ambiente.

65 Según la presente descripción, después de la etapa d) y antes de la etapa e), se implementa una secuencia de agitación a una velocidad superior (entre 800 y 1000 rpm durante de 1 a 2 min 30 s) con el fin de suspender los eritrocitos no aglutinados, opcionalmente seguido por una nueva etapa de agitación ("etapa de recogida") con el

fin de ensamblar aglutinados dispersados pequeños si están presentes a una velocidad inferior (entre 350 y 550 rpm, durante de 1 min a 2 min).

5 Asimismo se describe en la presente memoria que la prueba sérica es de tipo IgG, se lleva a cabo preliminarmente un reactivo aglutinado mezclando una disolución de anticuerpo anti-inmunoglobulina IgG con una disolución concentrada de la prueba sérica de anticuerpo de IgG.

10 En una forma de realización preferida, el método según la presente invención se caracteriza por que el reactor es una cúpula de microplaca con un fondo en forma redonda o en forma de V.

Según la presente descripción, la concentración de eritrocitos en la suspensión de partículas magnéticas que portan los eritrocitos es de entre el 0.2% y el 2.5%, preferentemente entre el 0.5% y el 1.5%, preferentemente el 1% ± 0.3%.

15 Además, la concentración de partículas magnéticas es de entre el 0.001% y el 0.007%, preferentemente entre el 0.003% y el 0.005%.

20 En una forma de realización preferida, el método según la presente invención se caracteriza porque el anticuerpo anti-GPA es un anticuerpo de mamífero, preferentemente de origen murino o humano, y apto para reconocer específicamente la glicoforina A humana portada por los eritrocitos, preferentemente dirigido contra la sialoglicoproteína glicoforina A, preferentemente contra su dominio extramembranoso.

25 El anticuerpo anti-GPA es un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo de la parte extracelular de la sialoglicoproteína glicoforina A, llevando dicho epítipo parcialmente o nada en absoluto del antígeno M o N, particularmente no conteniendo dicho epítipo el fragmento de aa 1-5 N-terminal de la glicoforina A.

Además, el anticuerpo anti-GPA se acopla a las partículas magnéticas en una concentración de entre 5 µg/mg y 25 µg/mg de partículas magnéticas, preferentemente desde 20 µg/mg ± 3 µg/mg de partículas magnéticas.

30 Además, con el fin de mejorar y/o aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas, se acopla anticuerpo anti-GPA a las partículas magnéticas en una concentración de entre 1 µg/mg y 5 µg/mg de partículas magnéticas, con una preferencia de 2.5 µg/mg ± 0.5 µg/mg de partículas magnéticas.

35 Asimismo se describe que la suspensión de partículas magnéticas es una suspensión que incluye un detergente no iónico, preferentemente synperonic™ PE/F68, Tween™ (20, 40 o 80) con una concentración de entre el 0.1% y el 1% (p/v), preferentemente entre el 0.25% y el 0.75% (m/v), o 0.5% ± 0.15%.

40 La presente invención permite, asimismo, llevar a cabo la agrupación y/o el fenotipado de sangre utilizando la técnica de inmunoadherencia sobre una fase sólida, tal como se describe en las pruebas de detección de anticuerpos irregulares (IAT) y en las que el suero del paciente se reemplaza por pruebas séricas de especificidades conocidas y los grupos de muestras de glóbulos rojos se reemplazan por los glóbulos rojos del paciente o del donante que van a agruparse o fenotiparse.

45 Los antígenos de diversos sistemas sanguíneos podrían ser de grupo o fenotipo dependiendo del antisuero utilizado, es decir anti-D, anti-Fya, anti-Fyb, anti-Jka, anti-Jkb, anti-S, anti-s, u otros antisueros específicos de otros antígenos de grupo sanguíneo.

50 El principio de la técnica de inmunoadherencia que permite el fenotipado consiste en magnetizar los glóbulos rojos del donante o del paciente con perlas acopladas con anticuerpo anti-GPA y sensibilizarlas con antisueros de interés específicos. La presencia de un antígeno se revelará mediante la captura del antisuero unido sobre los glóbulos rojos mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina unido al fondo del pocillo de una microplaca.

55 La agrupación y/o el fenotipado de un paciente o donante se lleva a cabo a partir de una muestra de sangre recogida sobre un tubo con un anticoagulante de tipo EDTA, citrato o heparina.

60 Se realiza una suspensión globular de entre el 1% y el 2%, preferentemente el 1%, en un tubo o en el pocillo de una placa con un fondo redondo, diluyendo 10 µl de glóbulos rojos empacados en 1 ml de diluyente que contiene las perlas magnéticas acopladas con anticuerpo anti-GPA. La concentración de las perlas en el diluyente, compuestas por polímero basado en azúcar diluido en un tampón de baja fuerza iónica = Liss Ficoll, puede variar desde el 0.002% hasta el 0.006%, con una preferencia por el 0.004%.

65 En paralelo, en un pocillo de una microplaca de fondo redondo de 96, recubierta con un antiglobulina específica anti-IgG o con una combinación de antiglobulinas (anti-IgG y anti-IgM), se deposita una disolución viscosa o un gel de mayor densidad, y permite crear una barrera entre el medio de reacción que contiene los glóbulos rojos del paciente o donante y el antisuero. La suspensión globular al 1% previamente diluida en la disolución que contiene

las perlas magnéticas acopladas con anti-GPA se deposita por encima de la barrera viscosa. Entonces se añade antisuero de interés específico sobre la suspensión globular.

5 La microplaca se incuba entonces durante 20 minutos a 37°C. Durante la etapa de incubación, los antisueros se unen al antígeno correspondiente presente o no sobre los glóbulos rojos. Durante esta fase de sensibilización de los glóbulos rojos mediante el antisuero, los glóbulos rojos se magnetizan asimismo mediante las perlas magnéticas acopladas con anti-GPA, presentes en el diluyente. Al ser cada anticuerpo específico para un antígeno, la unión del primero no impide la unión del otro. Por tanto, los glóbulos rojos del paciente o el donante que llevan o no los antígenos de glóbulos rojos podrían magnetizarse mediante las perlas anti-GPA así como sensibilizarse mediante los anticuerpos presentes en el antisuero. Al final de la etapa de incubación, la microplaca se coloca sobre un agitador de microplaca equipado con una placa magnética que se ajusta perfectamente bajo los pocillos de la microplaca. Bajo la influencia de la agitación y el campo magnético, los glóbulos rojos magnetizados mediante anti-GPA, que llevan o no los anticuerpos del antisuero, se moverán a través de la barrera viscosa y se unirán o no a la antiglobulina fijada en el fondo del pocillo. Una reacción positiva conducirá a la formación de una película delgada de glóbulos rojos en el fondo del pocillo, mientras que una reacción negativa conducirá a la formación de un sedimento de glóbulos rojos nítido en el fondo del pocillo.

20 Se describe en la presente memoria que la concentración de eritrocitos en la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos es del 0.2% al 2.5%, preferentemente entre el 0.5% y el 1.5%, preferentemente entre el 1% y $\pm 0.3\%$.

Además, la concentración de partículas magnéticas en dicha suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos está comprendida entre el 0.02% y el 0.2%, preferentemente entre el 0.01% y el 0.009%, preferentemente el $0.004\% \pm 0.001\%$.

25 La concentración de partículas magnéticas en dicha suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos es del $0,007\% \pm 0.001\%$.

30 Asimismo se describe que el anticuerpo anti-GPA es un anticuerpo de mamífero, preferentemente de origen murino o humano, y apto para reconocer específicamente la glicoforina A humana portada por los eritrocitos, preferentemente dirigido contra la sialoglicoproteína glicoforina A, preferentemente contra su dominio extramembranoso, preferentemente todavía un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo de la parte extracelular de la sialoglicoproteína glicoforina A, llevando dicho epítipo parcialmente o no todo el antígeno M o N, particularmente no conteniendo dicho epítipo el fragmento aa1-5N-terminal de la glicoforina A.

35 Además, el anticuerpo anti-GPA se acopla con partículas magnéticas con una concentración que está comprendida entre $5 \mu\text{g}/\text{mg}$ y $25 \mu\text{g}/\text{mg}$ de partículas magnéticas, preferentemente a una concentración de $20 \mu\text{g}/\text{mg}$ de partículas magnéticas.

40 Además, con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas, el anticuerpo anti-GPA se acopla con las partículas magnéticas en una concentración de entre $1 \mu\text{g}/\text{mg}$ y $5 \mu\text{g}/\text{mg}$ de partículas magnéticas, con una preferencia de $2.5 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ de partículas magnéticas.

45 Según la presente descripción, dicha suspensión de partículas magnéticas está a una concentración de entre el 0.004% y el 0.002% (p/v) y más preferentemente a una concentración del $0.007\% \pm 0.001\%$. El acoplamiento del anticuerpo anti-GPA se lleva a cabo sobre perlas magnéticas que contienen grupos funcionales.

50 Estos grupos funcionales pueden ser de diferentes tipos tales como funciones amino (-NH₂) o grupos alcohólicos (-OH), grupos ácido carboxílico (-COOH) o grupos tosilo, todas estas funciones las conoce bien el experto en la materia.

Las interacciones así establecidas entre el anticuerpo y la perla magnética pueden ser de naturalezas electrostática, hidrófoba o covalente.

55 La unión covalente del anticuerpo sobre las perlas magnéticas se lleva a cabo por medio de grupos funcionales en la superficie de las perlas.

60 Los proveedores de microperlas magnéticas (o partículas) adecuadas para su utilización dentro del alcance de la presente invención incluyen en particular Ademtech (33600 Pessac, Francia), que suministra partículas magnéticas con un diámetro de alrededor de 100 a 500 nm que pueden funcionalizarse mediante un ácido o amina, así como protocolos y reactivos que hacen posible llevar a cabo la

65 Estas partículas magnéticas consisten en más del 50% de un núcleo ferromagnético (tal como óxido de hierro), recubriéndose este núcleo con poliestireno. Otras empresas asimismo incluyen Bioclone Inc. (San Diego, CA, EE.UU.) que suministra una gama completa de perlas magnéticas funcionalizadas. Además, está asimismo Dynal

Biotech GmbH (Hamburgo, Alemania) con su amplia gama de Dynabeads™, que ofrece en particular microperlas magnéticas activadas con estreptavidina, tosilo o un grupo ácido carboxílico. Otras empresas que pueden mencionarse son Merck Chimie SAS (94126 Fontenay-sous-Bois, Francia) que presenta la gama Estapor™ de microperlas magnéticas con diferentes tamaños de partícula (de 200 nm a 1,5 μm) basadas en poliestireno o divinilbenceno que contiene hasta el 50% de ferritas y que pueden estar funcionalizadas o no, por ejemplo mediante un grupo ácido o amina, o grupo tosilo. Estas partículas se preparan mediante un método que utiliza polimerización de estireno en presencia de un compuesto ferromagnético.

Finalmente, puede citarse la empresa JSR Micro (Japón), que propone diferentes tamaños de partículas magnéticas, desde 1 μm hasta 3 μm funcionalizadas con estreptavidina o mediante grupo ácido carboxílico o tosilo. Las perlas magnéticas de JSR se componen de una partícula núcleo recubierta con una sustancia magnética, que está cubierta por un monómero para encapsular la sustancia magnética. Entre estas partículas propuestas, se preferirán perlas hidrófobas de 1 μm de tamaño con aproximadamente un 48% de contenido de hierro y una tasa de funciones carboxílicas de aproximadamente 15 nm por mg de perlas. Estas perlas pueden acoplarse mediante adsorción física o mediante acoplamiento químico.

Preferentemente, la invención incluye el use de perlas superparamagnéticas, preferentemente partículas magnéticas con un tamaño de hasta entre 200 nm y 1.5 μm, preferentemente hidrófobas y funcionalizadas con grupos ácido carboxílico o tosilo.

La tasa promedio de hierro de las perlas magnéticas es de aproximadamente el 45% para perlas carboxílicas y de aproximadamente el 30% para perlas de tosilo.

En la presente descripción, perlas o partículas presentan el mismo significado para designar "partículas magnéticas".

La tasa de funcionalización para grupos funcionales es variable, para perlas del tipo tosilo el número de funciones varía entre 40 y 80 μeq/g de perlas, mientras que para perlas con grupos carboxílicos, el número de funciones puede variar entre 20 μeq/gr y 350 μeq/g de perlas.

En esta invención se prefiere utilizar perlas magnéticas de ESTAPOR™, con un tamaño de desde 200 hasta 300 nm, que contienen por lo menos el 40% de compuesto ferromagnético, y varias funciones carboxílicas de aproximadamente 130 μeq por gramo de perlas, obtenidas bajo la referencia M1-030/40. O con el mismo proveedor, pueden utilizarse perlas magnéticas que contienen funciones tosilo que oscilan entre 40 y 80 μeq/gramo de perlas, para una perla de aproximadamente 1.2 μm de diámetro y obtenida con la referencia R01-24.

Otra alternativa que se preferirá, para esta invención, es la utilización de perlas magnéticas de la empresa JSR Micro de 1 μm de diámetro, del tipo hidrófobo funcionalizadas con grupos carboxílicos a una tasa de 17 nmol/gramo de perlas y obtenidas con la referencia MB100.

Para perlas funcionalizadas con grupos ácido carboxílico, se preferirá una adsorción física en vez de un acoplamiento químico.

Las perlas se acoplan con un anticuerpo monoclonal murino purificado, de isotipo IgG2a, específico de la glicoforina A.

La concentración del anticuerpo anti-glicoforina A, acoplado con las perlas magnéticas funcionalizadas, puede variar de desde 5 μg/mg de perlas hasta 25 μg/mg de perlas, con una preferencia por una concentración de 20 μg/mg de perlas. Más preferentemente, con el fin de mejorar y/o aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas, se acopla anticuerpo anti-GPA a las partículas magnéticas en una concentración de entre 1 μg/mg y 5 μg/mg de partículas magnéticas, con una preferencia de 2.5 μg/mg ± 0,5 μg/mg de partículas magnéticas.

Al final del acoplamiento, la disolución que contiene las perlas acopladas con el anticuerpo anti-glicoforina A consiste en tampón PBS con BSA al 0.1% (m/v) así como un detergente no iónico, como el tipo synperonic™ PE/F68. El synperonic™ PE/F68 es un tensioactivo hidrófilo no iónico asimismo denominado poloxámero synperonic™ F68 y disponible en Sigma Aldrich con la referencia: 81 112. Este polímero hecho de tres bloques consiste en una parte central hidrófoba realizada en bloques de polioxipropileno, rodeada por 2 bloques hidrófilos de polioxietileno.

La utilización de un detergente se prefiere particularmente cuando se utilizan nano o micropartículas, con el fin de evitar la agregación espontánea de estas partículas magnéticas que puede suceder en condiciones particulares de pH, de fuerza iónica y temperatura. Se ha demostrado particularmente que la superficie cambiante de las partículas por medio de la adsorción de macromoléculas anfífilas no iónicas tales como poloxámeros contribuye a la no agregación de las partículas magnéticas en disolución.

Particularmente cuando las partículas se ponen en la disolución en un tampón de alta fuerza iónica, tal como el PBS (solución salina tamponada con fosfato), la nano/micropartículas tienden a perder su estabilidad coloidal y a

agregarse. La adición de un tensioactivo permite por tanto garantizar esta estabilidad coloidal y evitar una agregación de las partículas en un tampón de alta fuerza iónica.

5 Existen varios tipos de tensioactivo no iónico tal como el Tween™ 20, 60 y 80 o el Synperonic™ PE/F68 o F127. En esta invención se prefiere utilizar el synperonic™ PE/F68.

10 Para garantizar una acción eficaz sobre la estabilidad coloidal de las perlas acopladas con los diferentes anticuerpos, la concentración del synperonic™ debe ser superior al 0.1% e inferior al 2.5%, que es el punto de viabilidad de las células en presencia de esta concentración de tensioactivo. Con una preferencia por una concentración del 0.5% (m/v).

15 Según la descripción, dicha suspensión de partículas magnéticas es una suspensión que contiene un detergente, preferentemente no iónico, preferentemente elegido de entre los poloxámeros, tales como el synperonic™ PE/F68, o elegido entre los Tween™ (20, 40, 60 o 80), estando dichos detergentes a una concentración de entre el 0.1% y el 1% (p/v), con preferencia por el 0.25% y el 0.75% (p/v) o el 0,5% ± 0,15%.

20 Una vez acopladas, las perlas se reservan entonces a una concentración del 1% (m/v) en una disolución que contiene PBS (0.3 M) + BSA al 0.1% (p/v) + 0.5 (p/v) de synperonic™ PE/F68, esto hasta su dilución en el diluyente final.

Con el fin de mejorar y/o aumentar la estabilidad de las partículas magnéticas acopladas con el anticuerpo anti-GPA, la concentración de detergente no iónico es de entre el 0.5% y el 10% (p/v), con una preferencia por el 5% (p/v) de detergente no iónico.

25 Entonces las perlas se diluyen en una concentración del 0.004% o, preferentemente el 0.007%, en el diluyente final que se distribuirá sobre la disolución viscosa (asimismo denominada filtro de barrera o asimismo denominada gel) por encima de la AHG.

30 Este diluyente final en el que se diluyen las perlas acopladas con el anticuerpo anti-glicoforina A es de una densidad superior a 1 y se compone preferentemente de un tampón de baja fuerza iónica (o tampón "LISS" o "BFI") y un polímero hidrófilo, preferentemente un polisacárido hidrófilo, particularmente el Ficoll™ 400. La concentración de este polisacárido, en el tampón de baja fuerza iónica, es preferentemente del 2%. El tampón de baja fuerza iónica lo conoce bien el experto en la materia en inmunohematología, porque facilita y acelera las reacciones entre los anticuerpos y los glóbulos rojos.

35 Este tampón puede prepararse según sea apropiado en presencia de una concentración final de albúmina sérica (BSA) de entre el 1.5% y el 6% (p/v), que permite conseguir una determinada viscosidad en el medio y controlar la velocidad de progresión de los glóbulos rojos hacia la parte de revelado de la microplaca. La desventaja de utilizar un tampón que contiene albúmina es su tendencia a formar espuma.

40 Por tanto, se prefiere sustituirla por un compuesto que no presente espuma. Se elige Ficoll™ 400, un polímero de azúcares que puede hidratarse bastante fácilmente y que es particularmente estable en disolución. Es un producto sintético cuya reproducibilidad está demostrada, debido a su utilización en muchos protocolos biológicos de separación de células. Su densidad es por tanto reproducible; es incoloro y no forma espuma debido a su estructura que interacciona libremente con el agua. La concentración utilizada permite conseguir una densidad de disolución igual a la obtenida con albúmina al 3%. Opone una amortiguación necesaria y suficiente los glóbulos rojos en progresión. La densidad del diluyente que contiene el 2% de Ficoll™ 400 es por tanto igual a 1.013 g/cm³.

50 Ejemplo de composición preferida para el diluyente que contiene las partículas magnéticas:

Para 1 litro:

- Na₂HPO₄, 2H₂O: 0.213 g

55 - NaH₂PO₄, 2H₂O: 0.240 g

- NaCl: 1.788 g

- Glicina: 18.05 g

60 - Azida de Na: 0.9 g

- Ficoll 400: 20 g

65 Osmolaridad: 310 +/- 20 mOsm

pH: 6.75 +/- 0.1

En algunas aplicaciones, notablemente cuando esto implica mejorar la sensibilidad o la velocidad de reacción (sin embargo, sin aumentar la no especificidad de la prueba), puede utilizarse un tampón de baja fuerza iónica ISB, asimismo denominado tampón LISS (LISS para disolución de baja fuerza iónica).

El experto en la materia sabrá que tampón o disolución salina se refiere anteriormente a tampones comúnmente utilizados en el campo de biología celular, particularmente inmunohematología, con el fin de prevenir la lisis de glóbulos rojos, particularmente para aplicaciones de IAT o fenotipado. Tales tampones o disoluciones pueden ser, por ejemplo, tampones a un pH fisiológico de entre 6.8 y 7.5 ajustándose la molaridad de los constituyentes de los tampones de manera que la disolución final obtenida sea similar en cuanto a presión osmótica a la molaridad de una disolución de tipo NaCl al 9 por mil (próxima a NaCl 0.15 M). En particular, puede mencionarse pero sin que esto sea limitativo tampón fosfato de tipo PBS a pH 7.0 - 7.4, bien conocido por el experto en la materia.

La composición de los tampones ISB o LISS no se describirá por tanto en la presente memoria ya que estos tampones se conocen bien en inmunohematología por su capacidad para reforzar reacciones de aglutinación. Estos tampones están disponibles de proveedores de reactivos para hematología (por ejemplo, puede mencionarse pero sin que esto sea limitativo un tampón LISS que presenta la siguiente composición, glicina 16 g/l, NaCl 0.03 M y fosfato 0.015 M a pH 6.7).

En otra forma de realización preferida, la presente invención se lleva a cabo para implementar una prueba de compatibilidad entre el donante y el receptor, o para implementar una prueba de Coombs directa.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la agrupación y/o el fenotipado de sangre caracterizado por que incluye:

- a) un reactivo que contiene una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA, y
- b) una prueba sérica que contiene anticuerpo de especificidad de grupo/fenotipo sanguíneo conocida en disolución o en una forma secada.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit formado para la demostración de un complejo específico formado por la reacción entre un anticuerpo anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo, presente en la disolución y un antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo portado por el eritrocito, caracterizado por que incluye:

- a) un reactivo que incluye una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-GPA, preferentemente tal como se define en uno de los métodos según la invención;
- b) un reactor o conjunto de reactores con una parte superior abierta y una base sellada cuyo diámetro disminuye por lo menos en la zona próxima a la base de tal manera que forma una pared inclinada que está por lo menos parcialmente con un anticuerpo anti-inmunoglobulina o con otro compuesto apto para unirse al anticuerpo de dicho complejo formado, y
- c) una suspensión de eritrocitos de prueba de fenotipo conocido para acoplarse a dichas partículas magnéticas.

El kit puede comprender además:

- un recipiente que contiene una disolución viscosa, o si es necesario, estando cada reactor parcialmente lleno con dicha sustancia viscosa, siendo dicha sustancia viscosa tal como se define en uno de los métodos según la presente invención,
- un recipiente que contiene un diluyente, siendo dicho diluyente una disolución que incluye un polímero hidrófilo, preferentemente de naturaleza polisacáridica, preferentemente Ficoll™, particularmente Ficoll™ 400, con una concentración que está comprendida entre el 1% y el 2.5% (m/v), preferentemente entre el 2% ± 0.3%,
- por lo menos un imán o un grupo de imanes que pueden estar colocados externamente por debajo del/de los reactor(es), acoplados con el agitador rotatorio.

Opcionalmente, la sustancia viscosa y si es necesario las partículas magnéticas o la suspensión de eritrocitos magnetizados, o si es necesario las características del imán y del agitador rotatorio, presentan las características tal como se definen para los métodos según la invención con asimismo las preferencias especificadas para estas disoluciones viscosas u otros compuestos y elementos.

Opcionalmente, la suspensión de eritrocitos prueba de fenotipo conocido, en la que los eritrocitos se acoplarán con

dichas partículas magnéticas de la suspensión, es del grupo O, y presenta una concentración de entre el 0.2% y el 2.5%, preferentemente entre el 0.5% y el 1.5%, preferentemente el $1\% \pm 0.3\%$.

5 En la presente explicación las palabras eritrocitos, glóbulo rojo y glóbulo rojo sanguíneo se utilizarán igualmente para nombrar a la misma célula sanguínea.

En el kit dado a conocer en la presente memoria, dicho reactor es una cúpula de microplaca, preferentemente con un fondo de forma redonda (hemisférica) o con un fondo en forma de V, siendo la microplaca que consiste en 96 cúpulas la más preferida.

10 Las figuras y los encabezamientos a continuación así como los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención.

Figuras:

15 Figuras 1A y 1B: Diagrama de la vista superior (figura 1A) y vista desde el lateral (figura 1B) de la plataforma de agitación (Teleshake™) que consiste en una placa de hierro blando bajo la microplaca bajo la cual la placa de hierro blando de cada imán se fija magnéticamente en forma de un apilamiento bajo cada una de las cúpulas de microplaca.

20 (1) Espaciador de plástico que hace posible obtener una buena separación entre los imanes; (2) elementos que hacen posible calzar la microplaca sobre el Teleshake; (3) cuña de Teleshake que hace posible calzar la microplaca; (4) imanes de apilamiento; (5) microplaca; (6) espaciador de plástico; (7) placa de hierro suave sobre la que los imanes se fijan magnéticamente; (8) placa de cartón que aísla el Teleshake del campo magnético del apilamiento de imanes; (9) bandeja rotatoria del Teleshake.

25 Figuras 2A y 2B: Diagrama de una cúpula de reactor de base redonda (o forma de U) tras el recubrimiento con anticuerpo anti-inmunoglobulina sobre la pared inclinada (parcialmente) y la base de la cúpula antes de la adición de la disolución viscosa y diversas disoluciones y reactivos (figura 2A). Diagrama de una cúpula de reactor de base redonda (o forma de U) tras el recubrimiento con anticuerpo anti-inmunoglobulina sobre la pared inclinada (parcialmente) y la base de la cúpula tras la adición de la disolución viscosa y la suspensión de eritrocitos "magnetizada" en el diluyente, y la adición de plasma o suero que va a someterse a prueba (ejemplo entre otros) (figura 2B).

30 Figura 3: Fotografía que muestra una imagen de una reacción de inmunoadhesión positiva con antígenos portados por eritrocitos (formación de un complejo específico que se adhiere a la pared inclinada recubierta con anticuerpo anti-inmunoglobulina) (figura a la izquierda) y fotografía que muestra una imagen de una reacción de inmunoadhesión negativa con antígenos portados por el eritrocito (sin formación de complejo específico) (figura a la derecha).

35 Figura 4: Prueba de anticuerpos irregulares (IAT) utilizando la metodología n.º 3.

Figura 5: Titulación de CNRGS (French National Reference Centre for Blood Groups), anti-D con la prueba de anticuerpos irregulares.

45 Figuras 6 y 7: Prueba cruzada (prueba de compatibilidad) realizada con donantes de grupo sanguíneo O.

Figura 8: Acoplamiento del anticuerpo anti-glicoforina A (GPA) sobre las perlas magnéticas.

50 Figura 9: Principio de magnetización de glóbulos rojos humanos mediante anticuerpos anti-glicoforina A recubiertos sobre partículas magnéticas.

Figuras 10-12: Tres métodos de magnetización de eritrocitos con perlas acopladas a anticuerpo anti-GPA en la prueba de anticuerpos irregulares.

55 Figura 13: Método de aglutinación para la agrupación (incluyendo la prueba de Simonin) y el fenotipado de 8 pacientes.

Figura 14: Método de aglutinación para el fenotipado extendido de 5 pacientes.

60 Figura 15: Método de inmunoadherencia para el fenotipado extendido de 8 donantes.

Figura 16: Método de inmunoadherencia para el fenotipado de D débil de 48 donantes.

65 Figura 17: Mejora de la sensibilidad y la especificidad de la prueba cruzada, reduciendo la concentración de anticuerpo anti-GPA acoplado a perlas magnéticas. Estudio comparativo.

Figura 18: Estudio de estabilidad entre 2 concentraciones de detergente no iónico (el 0,5% frente al 5%) durante el almacenamiento de partículas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA.

Ejemplo 1: Material y métodos

5

A) Ejemplo del acoplamiento del anticuerpo anti-glicoforina A a perlas magnéticas activadas con tosilo (ver la figura 8)

10 El acoplamiento del anticuerpo anti-glicoforina A a partículas magnéticas activadas con tosilo de ESTAPOR™ (referencia: R01-24) puede realizarse con un tampón borato de sodio 0,1 M pH 9.5 o con un tampón fosfato 0,1 M pH 7.4.

15 Antes del acoplamiento, las partículas magnéticas activadas con tosilo se lavan dos veces utilizando un imán en el tampón de acoplamiento elegido. El acoplamiento se realiza resuspendiendo las perlas en el tampón de acoplamiento (borato o fosfato) y añadiendo el anticuerpo a una concentración de 10 µg por mg de perlas. El acoplamiento del anticuerpo se realiza en presencia de sulfato de amonio 3 M.

- 20 - Se lavan 25 mg de partículas magnéticas de tosilo (es decir, 250 µl de perlas al 10% p/v) dos veces utilizando un imán en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 o tampón borato de sodio 0.1 M pH 9.5.
- 25 - Eliminar por pipeteo cuidadosamente el sobrenadante, una vez que las perlas hayan migrado al imán y el líquido está transparente.
- 30 - Retirar el tubo del imán y resuspender las perlas con 10 µg de anticuerpo anti-glicoforina A.
- 35 - Añadir 250 µl de sulfato de amonio 3 M a la suspensión de perlas para lograr una concentración final de sulfato de amonio 1.5 M.
- 40 - Resuspender las perlas concienzudamente mediante agitación con vórtex.
- 45 - Incubar durante 24 h-48 h a temperatura ambiente con rotación en inclinación lenta.
- 50 - Al final del acoplamiento, colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- 55 - Retirar el tubo del imán y resuspender las perlas en un tampón de bloqueo que contiene solución salina de tampón fosfato (PBS) 0.3 M con BSA al 0.5% (p/v).
- 60 - Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con rotación en inclinación lenta.
- 65 - Al final de la etapa de bloqueo, colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- 70 - Retirar el tubo del imán y resuspender las perlas con una disolución conservante que contiene PBS 0,3 M con BSA al 0.1% (p/v) y el 0.5% (p/v) de synperonic™ PE/F68. La concentración final de las perlas acopladas con anticuerpo anti-glicoforina A es del 1% (p/v) en el tampón conservante. Las perlas se almacenan a 4°C hasta su utilización.

B) Ejemplo de acoplamiento del anticuerpo anti-glicoforina A a perlas magnéticas con ácido carboxílico de ESTAPOR™

El método preferido de acoplamiento del anticuerpo anti-GPA a perlas magnéticas con ácido carboxílico de ESTAPOR™ es mediante adsorción física (ref.: M1-030/40).

55 La concentración de anticuerpo anti-GPA utilizada varía de desde 5 µg hasta 25 µg por mg de perlas con preferencia por 10 µg de anticuerpo anti-GPA por mg de perlas.

El acoplamiento de anticuerpo anti-GPA a perlas magnéticas con ácido carboxílico se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 60 - Se lavan 25 mg de partículas magnéticas con ácido carboxílico (es decir, 250 µl de perlas al 10% p/v) dos veces utilizando un imán en 1 ml de tampón fosfato 10 mM pH 6.
- 65 - Al final de la etapa de lavado, colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.

ES 2 779 043 T3

- Retirar el tubo del imán y resuspender las perlas con 1.5 ml de tampón fosfato 20 mM pH 7.5.
- Añadir inmediatamente el anticuerpo anti-GPA a una concentración de 10 µg por mg de perlas.
- 5 - Mezclar concienzudamente agitando con vórtex.
- Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con una agitación en inclinación lenta.
- 10 - Colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- Lavar 3 veces las perlas con tampón fosfato 20 mM pH 7.5 colocando el tubo sobre el imán.
- 15 - Al final de la etapa de lavado, resuspender las perlas en un tampón de bloqueo que contiene solución salina de tampón fosfato (PBS) 0.3 M con BSA al 0.5% (p/v).
- Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con una agitación en inclinación lenta.
- 20 - Al final de la etapa de bloqueo, colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- 25 - Retirar el tubo del imán y resuspender las perlas con una disolución conservante que contiene PBS 0,3 M con BSA al 0.1% (p/v) y el 0.5% (p/v) de synperonic™ PE/F68. La concentración final de las perlas acopladas con anticuerpo anti-glicoforina A es del 1% (p/v) en el tampón conservante. Las perlas se almacenan a 4°C hasta su utilización.

C) Ejemplo de acoplamiento del anticuerpo anti-glicoforina A a perlas magnéticas con ácido carboxílico de JSR Micro

30 El método preferido de acoplamiento del anticuerpo anti-GPA a perlas magnéticas con ácido carboxílico de JSR Micro es mediante adsorción física (ref.: Magnospheres MB100).

La concentración de anticuerpo anti-GPA utilizada varía de desde 5 µg hasta 25 µg por mg de perlas con preferencia por 20 µg de anticuerpo anti-GPA por mg de perlas.

35 El acoplamiento de anticuerpo anti-GPA a 5 mg de perlas magnéticas con ácido carboxílico se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 40 - Se lavan 5 mg de partículas magnéticas con ácido carboxílico (es decir, 50 µl de perlas al 10% p/v) dos veces utilizando un imán en 200 µl de tampón MES 50 mM (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), pH 6.2.
- Al final de la etapa de lavado, colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- 45 - Añadir inmediatamente el anticuerpo anti-GPA a una concentración de 20 µg por mg de perlas.
- Mezclar concienzudamente agitando con vórtex.
- 50 - Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con una agitación en inclinación lenta.
- Colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- 55 - Lavar 3 veces las perlas con tampón MES 50 mM pH 6.2 colocando el tubo sobre el imán.
- Al final de la etapa de lavado, resuspender las perlas en un tampón de bloqueo que contiene solución salina de tampón fosfato (PBS) 0.3 M con BSA al 0.5% (p/v).
- 60 - Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con una agitación en inclinación lenta.
- Al final de la etapa de bloqueo, colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- 65 - Retirar el tubo del imán y resuspender las perlas con una disolución conservante que contiene PBS 0,3 M con BSA al 0.1% (p/v) y el 0.5% (p/v) de synperonic™ PE/F68. La concentración final de las perlas

acopladas con anticuerpo anti-glicoforina A es del 1% (p/v) en el tampón conservante. Las perlas se almacenan a 4°C hasta su utilización.

D) Dilución de las perlas acopladas en los diluyentes.

5 Una vez que las perlas se acoplan al anticuerpo anti-GPA, estas se diluyen directamente en el diluyente Liss y Ficoll™ al 2% (p/v), que luego se distribuye en la parte superior de la disolución viscosa o gel. La concentración de las perlas en el diluyente puede variar entre el 0,005% y el 0,02%, con preferencia por el 0.004%.

10 **Ejemplo 2: Recubrimiento de la pared inclinada y la base de la cúpula con un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana (AHG)**

15 La naturaleza química y fisicoquímica del plástico utilizado para las cúpulas hace posible cubrir estas últimas con una capa de anticuerpo humano anti-inmunoglobulina (de tipo HAG monoclonal o policlonal) apto para unirse específicamente a los anticuerpos de cualquier complejo específico que pueda formarse cuando el anticuerpo de dicho complejo es de origen humano.

20 Además, puede indicarse que esta composición de HAG puede incluir anticuerpos dirigidos contra determinantes de proteínas séricas de tipo complemento.

Las superficies de la pared interna del recipiente que no se recubren con AHG pueden saturarse utilizando agentes de saturación convencionales en técnicas de tipo fase sólida o ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas).

25 Por ejemplo, la disolución de AHG a una concentración entre 1 y 10 µg/ml puede prepararse en un tampón carbonato 0.2 M pH 9.6.

30 Esta disolución se distribuye a un volumen de 75 µl en cada cúpula de una microplaca de tipo Maxisorp NUNC U8 de base redonda. Las placas se incuban entonces durante la noche a 4°C.

Las cúpulas se lavan entonces utilizando una disolución de tampón fosfato (PBS 2.5 mM, pH 7.4) con el fin de eliminar cualquier proteína no adsorbida directamente sobre el plástico.

35 Las cúpulas se tratan entonces con una disolución de albúmina a 30 g/l en tampón PBS a una tasa de 100 µl por cúpula.

Tras la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavan las cúpulas de nuevo en tampón fosfato.

Ejemplo 3:

40 1º método: Magnetización de los glóbulos rojos con las perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA (anti-glicoforina A) en un pocillo separado

(Ver la figura 9 para el principio general de magnetización y la figura 10 para el método 1)

45 La detección de anticuerpos irregulares consiste en la utilización de glóbulos rojos con fenotipos conocidos denominados panel. Un panel consiste en tres fenotipos complementarios de células. En tres pocillos de una de placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo, se depositan 5 µl de perlas acopladas a anticuerpo anti-GPA, luego se añaden 45 µl de cada panel de glóbulos rojos diluido hasta el 1% en un tampón de almacenamiento.

50 Tras mezclas los dos componentes, se magnetizan inmediatamente los glóbulos rojos y están listos para utilizar en las siguientes etapas.

55 En tres pocillos de una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo, recubiertos con un anticuerpo específico anti-globulina humana (anti-IgG) o una mezcla de anticuerpos anti-globulina humana (anti-IgG y anti-IgM), se deposita una disolución viscosa o un gel con una densidad mayor de 1, y puede hacerse una barrera entre el medio de reacción que contiene las células y la prueba sérica y la antiglobulina.

60 Encima de la barrera se deposita un diluyente viscoso con una densidad mayor de 1, sobre el que se depositarán células magnetizadas por medio de anticuerpo anti-GPA, así como suero o plasma del paciente o donante que va a someterse a prueba.

65 La microplaca se incuba entonces a 37°C durante 20 minutos. Durante esta incubación los anticuerpos frente a glóbulos rojos presentes o no en el suero se unirán al glóbulo rojo magnetizado que porta los antígenos. Al final de la incubación, la microplaca se coloca sobre un agitador rotatorio equipado con una placa magnética. Durante la aplicación del campo magnético simultáneamente con la agitación, los eritrocitos magnetizados que portan o no

anticuerpo anti-eritrocito sobre su superficie se atraerán a través de la disolución viscosa y se unirán o no sobre la AHG recubierta sobre el fondo.

5 La agitación final bajo campo magnético consiste en 2 secuencias: la primera secuencia de agitación permite que los glóbulos rojos magnetizados y sensibilizados se capturen por las anti-globulinas y dura entre 2 min 30 s y 4 minutos a 500 rpm con una preferencia por 3 minutos a 500 rpm, mientras que la segunda secuencia de agitación permite formar la reacción negativa mediante la formación de un sedimento, esta secuencia dura entre 30 s y 2 minutos a 600 rpm con una preferencia por 1 min a 600 rpm.

10 En el caso de una reacción positiva, las células magnetizadas sensibilizadas con suero del paciente o donante (o plasma) se unirán a AHG y formarán una capa fina de eritrocitos en el fondo del pocillo.

15 En el caso de una reacción negativa, las células magnetizadas sensibilizadas con suero del paciente o donante (o plasma) formarán entonces un sedimento en el fondo del pocillo (ver la figura 3).

Ejemplo 4:

2º método: Magnetización de glóbulos rojos con perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA durante la sensibilización mediante suero o plasma. Depósito sucesivo de cada elemento.

20 (Ver la figura 11)

25 En tres pocillos de una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo, recubiertos con un anticuerpo específico anti-globulina humana (anti-IgG) o una mezcla de anticuerpos anti-globulina humana (anti-IgG y anti-IgM), se deposita una disolución viscosa o un gel con una densidad mayor de 1, y puede hacerse una barrera entre el medio de reacción que contiene las células y la prueba sérica y la antiglobulina.

30 Se deposita un diluyente encima de la barrera viscosa o gel, luego se depositan las perlas magnéticas acopladas al anticuerpo anti-GPA, luego glóbulos rojos diluidos hasta el 1% en su tampón de almacenamiento y finalmente se deposita plasma o suero del paciente (o donante) que va a someterse a prueba.

35 La microplaca se incuba entonces a 37°C durante 20 minutos. Durante la incubación, las perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA se unirán a los glóbulos rojos; esto es igual para los anticuerpos irregulares presentes o no en el suero o plasma que va a someterse a prueba. Al ser cada anticuerpo específico de un antígeno, la unión de uno a los glóbulos rojos no dificulta la unión del otro.

Por tanto, los glóbulos rojos que llevan antígenos podrían tanto magnetizarse como sensibilizarse mediante los anticuerpos presentes o no en el plasma del paciente.

40 Al final de la incubación, la microplaca se coloca sobre un agitador rotatorio equipado con una placa magnética. Con la aplicación del campo magnético simultáneamente con la agitación, los glóbulos rojos que portan o no anticuerpos irregulares se atraerán a través de la disolución viscosa y se unirán o no o sobre la AHG sobre el fondo. La agitación final bajo campo magnético consiste en 2 secuencias: la primera secuencia de agitación permite que los glóbulos rojos magnetizados y sensibilizados se capturen por las anti-globulinas y dura entre 2 min 30 s y 4 minutos a 500 rpm con una preferencia por 3 minutos a 500 rpm, mientras que la segunda secuencia de agitación permite formar la reacción negativa mediante la formación de un sedimento, esta secuencia dura entre 30 s y 2 minutos a 600 rpm con una preferencia por 1 min a 600 rpm.

50 Como en el ejemplo previo, en el caso de una reacción positiva, las células magnetizadas sensibilizadas con suero del paciente o donante (o plasma) se unirán a AHG y formarán una capa fina de eritrocitos en el fondo del pocillo. En el caso de una reacción negativa, las células magnetizadas sensibilizadas con suero del paciente o donante (o plasma) formarán entonces un sedimento en el fondo del pocillo.

55 En este método, no es necesario llevar a cabo la magnetización de glóbulos rojos en un pocillo separado, puesto que la magnetización es específica (por medio de anticuerpo anti-GPA) sin que pueda producirse interferencia durante esta última, de modo que la sensibilización de los glóbulos rojos por plasma del paciente puede producirse independientemente.

Ejemplo 5:

60 3º método: Magnetización de glóbulos rojos con perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA durante la sensibilización mediante suero o plasma. Dilución de las perlas magnéticas acopladas a GPA en el diluyente. (Ver la figura 12)

65 En este método, que se prefiere a los otros dos, las perlas se diluyen directamente en el diluyente que va a depositarse sobre el filtro. Por tanto el número de depósitos está limitado y el diluyente que contiene las perlas

acopladas con anticuerpo anti-glicoforina A se considera como un reactivo.

Como anteriormente, en 3 pocillos de una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo, recubiertos con un anticuerpo específico anti-globulina humana (IgG) o una mixture de anticuerpos anti-globulina humana (anti-IgG y anti-IgM), se introdujo una disolución viscosa o gel con una densidad mayor de 1, y puede ser una barrera entre el medio de reacción que contiene las células y la prueba sérica y la antiglobulina. El diluyente que contiene las perlas magnéticas acopladas con anticuerpo anti-GPA se deposita encima de la barrera viscosa o gel. Entonces se depositan glóbulos rojos diluidos hasta el 1% en su tampón de almacenamiento sobre el diluyente que contiene las perlas magnéticas y finalmente el plasma o suero de paciente (o donante) que va a someterse a prueba se deposita por encima de los glóbulos rojos.

En una forma de realización preferida, los glóbulos rojos ya se han mezclado con el diluyente que contiene las perlas magnéticas acopladas al anticuerpo anti-GPA, antes de depositarse encima de la barrera viscosa de una densidad mayor de 1. Entonces se añade plasma o suero a la mezcla de glóbulos rojos - diluyente - perlas magnéticas.

En una forma de realización automatizada, se prefiere lo siguiente: en 3 pocillos de una microplaca de 96 pocillos, de fondo redondo, recubiertos con un anticuerpo específico anti-globulina humana (IgG) o una mezcla de anticuerpos anti-globulina humana (anti-IgG y anti-IgM), se depositan los glóbulos rojos, y el diluyente que contiene las perlas magnéticas. Los dos componentes se mezclan colocando la placa sobre un agitador automático. Al final de la agitación, la barrera viscosa de alta densidad se inyecta por debajo de la mezcla de glóbulos rojos - diluyente - perlas magnéticas colocando las puntas del autómatas en el fondo de los pocillos. Debido a su densidad, la barrera viscosa permanece por debajo de la mezcla, evitando por tanto la saturación de la AHG por anticuerpos no específicos, mientras que la mezcla formada por las células y el diluyente que contiene las perlas magnéticas, menos densa, permanece por encima de la barrera viscosa.

Esto proporciona dos fases distintas con diferentes densidades: siendo la primera el gel de densidad superior sobre la AGH y conteniendo el diluyente perlas magnéticas acopladas con anticuerpo anti-GPA y mezcladas con glóbulos rojos. Entonces el plasma del paciente que va a someterse a prueba se colocará sobre la mezcla.

La microplaca se incuba entonces a 37°C durante 20 minutos. Durante incubación, los anticuerpos irregulares presentes o no en el plasma sometido a prueba se unirán a los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos que llevan antígenos podrían tanto magnetizarse como sensibilizarse mediante los anticuerpos presentes o no en el plasma del paciente. Al ser cada anticuerpo específico de un antígeno, la unión de uno a los glóbulos rojos no dificulta la unión del otro.

Al final de la incubación, la microplaca se coloca sobre un agitador rotatorio equipado con una placa magnética. Con la aplicación del campo magnético simultáneamente con la agitación, los glóbulos rojos que portan o no anticuerpos irregulares se atraerán a través de la disolución viscosa y se unirán o no sobre la AHG recubierta sobre el fondo. La agitación final bajo campo magnético consiste en 2 secuencias: la primera secuencia de agitación permite que los glóbulos rojos magnetizados y sensibilizados se capturen por las anti-globulinas y dura entre 2 min 30 s y 4 minutos a 500 rpm con una preferencia por 3 minutos a 500 rpm, mientras que la segunda secuencia de agitación permite formar la reacción negativa mediante la formación de un sedimento, esta secuencia dura entre 30 s y 2 minutos a 600 rpm con una preferencia por 1 min a 600 rpm.

Como en el ejemplo previo, en el caso de una reacción positiva, las células magnetizadas sensibilizadas con suero del paciente o donante (o plasma) se unirán a la AHG y formarán una capa fina de eritrocitos en el fondo del pocillo. En el caso de una reacción negativa, las células magnetizadas sensibilizadas con suero del paciente o donante (o plasma) formarán entonces un sedimento en el fondo del pocillo.

Todos estos métodos de magnetización pueden trasladarse a otras pruebas, tales como pruebas para la compatibilidad entre donante y receptor.

En este caso, las células del donante de la bolsa de transfusión se diluyen previamente hasta el 1% en un tampón de baja fuerza iónica, antes de colocarlas sobre el diluyente que contiene perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA.

Es lo mismo que para la prueba de Coombs directa, realizada en pacientes que se sospecha que se han sensibilizado *in vivo* por anticuerpos irregulares, especialmente en casos de incompatibilidades feto-maternas o enfermedades hemolíticas autoinmunitarias.

En estos casos, los glóbulos rojos sensibilizados *in vivo* se diluyen previamente hasta el 1% en un tampón de baja fuerza iónica, antes de colocarse sobre el diluyente que contiene perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA.

Ejemplo 6: Prueba de detección de anticuerpos irregulares utilizando el método n.º 3 (ver la figura 4).

Las perlas acopladas con anticuerpo anti-GPA se diluyen directamente en el diluyente (asimismo denominado Liss Ficoll), depositado el mismo sobre la barrera viscosa o gel (asimismo denominado Nanolys™) de tipo Sephadex™ G-100 superfino al 3% en una disolución de albúmina al 10% en Liss. Las células son de o bien un tubo primario del grupo de pacientes O y diluidas hasta el 1% en un tampón de baja fuerza iónica, o bien de un panel de glóbulos rojos del grupo O, diluidos hasta el 1% en un tampón de almacenamiento.

El antisuero utilizado (suero de prueba) procede de un paciente y contiene anticuerpos irregulares tales como anti-D+anti-C+anti-E. Esta muestra se somete a prueba a diferentes diluciones.

Los resultados esperados se llevaron a cabo en una técnica ya comercializada utilizando las mismas células y el mismo antisuero.

Protocolo:

En los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo recubiertos con un anticuerpo humano anti-globulina (anti-IgG) (asimismo denominado ScreenLys™) se depositan 50 µl de Nanolys™, se añaden luego 50 µl de Liss Ficoll que contiene perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA. Se añaden 15 µl de glóbulos rojos diluidos hasta el 1% y finalmente se añaden 15 µl de suero o plasma que va a someterse a prueba. Se coloca la microplaca en el incubador a 37°C durante 20 minutos, y luego se coloca la microplaca sobre un agitador equipado con una placa de imanes que se ajustan exactamente por debajo de cada pocillo de la microplaca. La agitación final bajo campo magnético consiste en 2 secuencias: 3 minutos a 500 rpm seguido por 1 min a 600 rpm.

Ejemplo 7: Titulación de un anticuerpo anti-D de CNRGS (French National Reference Centre for Blood Groups) utilizando una prueba de detección de anticuerpos irregulares (véase la figura 5)

Se utilizan series de dilución de anticuerpo anti-D patrón de CNRGS, como antisuero sometido a prueba con paneles de glóbulos rojos del grupo O diluidos hasta el 1% en tampón de conservación.

Esta titulación de anticuerpo anti-D patrón permite demostrar el umbral de detección del método descrito.

Protocolo:

En los pocillos de una Screenlys™ (placa recubierta con un anticuerpo humano anti-globulina (anti-IgG)) se depositan 50 µl de Nanolys™, y luego se añaden 50 µl de Liss Ficoll que contiene perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA sobre el Nanolys™. Se añaden 15 µl de glóbulos rojos diluidos hasta el 1% y finalmente se añaden 15 µl de cada dilución de anticuerpo anti-D que va a someterse a prueba. Entonces se incuba la placa a 37°C durante 20 minutos, y luego se coloca sobre un agitador equipado con una placa de imanes que se ajustan exactamente por debajo de cada pocillo de la microplaca. La agitación final bajo campo magnético consiste en 2 secuencias: 3 minutos a 500 rpm seguido por 1 min a 600 rpm.

Los resultados muestran que la prueba de detección de anticuerpos irregulares es sensible y capaz de detectar hasta 1.25 ng/ml de anticuerpo anti-D.

Este método de magnetización es bastante comparable en sensibilidad y especificidad a métodos ya comercializados.

Ejemplo 8: Prueba cruzada (prueba de compatibilidad) realizada en donantes de glóbulos rojos del grupo O (ver las figuras 6 y 7).

Se someten a prueba glóbulos rojos del grupo O de donantes recogidos en tubos con EDTA frente al plasma o suero de pacientes que es probable que contengan o no anticuerpos anti-eritrocitos irregulares.

Los resultados se presentan a continuación.

Protocolo:

A partir del donante de tubo primario, se diluyen 10 µl de glóbulos rojos empaquetados en 1 ml de tampón de baja fuerza iónica, para preparar una suspensión de eritrocitos al 1%.

En los pocillos de una ScreenLys™ (placa recubierta con un anticuerpo humano anti-globulina (anti-IgG)) se depositan 50 µl de Nanolys™, y luego se añaden 50 µl de Liss Ficoll que contiene perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA sobre el Nanolys™. Se añaden 15 µl de glóbulos rojos diluidos hasta el 1% y finalmente se añaden 15 µl del plasma o suero del paciente que va a transfundirse. Entonces se incuba la placa a 37°C durante 20 minutos, y luego se coloca sobre un agitador equipado con una placa de imanes que se ajustan exactamente

por debajo de cada pocillo de la microplaca. La agitación final bajo campo magnético consiste en 2 secuencias: 3 minutos a 500 rpm seguido por 1 min a 600 rpm.

Los resultados obtenidos en este método de magnetización utilizando perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo específico para glóbulos rojos pueden demostrar claramente la capacidad para determinar la compatibilidad sanguínea entre donante y receptor, en diferentes sistemas sanguíneos.

Ejemplo 9: Agrupación/fenotipado de sangre incluyendo la prueba de Simonin, método utilizando anticuerpos aglutinantes de tipo IgM

A) Método de aglutinación

Antes de llevar a cabo la prueba, se realiza una disolución de magnetización diluyendo perlas magnéticas acopladas con anticuerpo anti-GPA en un tampón fosfato 0,3 M que contiene el 0,1% de BSA (p/v) y el 0.5% de synperonic™ PE/F68. La concentración de perlas magnéticas acopladas con anticuerpo anti-GPA puede variar desde el 0.001% hasta el 0.004%, preferentemente al 0.003%.

En el caso de una prueba directa o prueba de Beth-Vincent, anticuerpos monoclonales específicos para antígenos de glóbulos rojos del sistema ABO (anti-A, anti-B y anti-AB), del sistema Rhesus (D, C, c, E, e) y de antígeno Kell se secan en los pocillos de fondo de forma redonda de una microplaca de 96 pocillos.

La implementación del tipado para antígenos de interés sobre los glóbulos rojos de un individuo se lleva a cabo sobre una muestra de sangre recogida en un tubo con anticoagulante tal como EDTA, citrato o heparina.

Se lleva a cabo una suspensión globular entre el 0.5% y el 1.2%, preferentemente al 1%, en un tubo o en el pocillo de una microplaca de fondo de forma redonda, diluyendo 10 µl de sedimento globular en 1 ml de un tampón de baja fuerza iónica, en particular un tampón LISS.

En los pocillos de una microplaca de 96 pocillos de fondo de forma redonda que contienen los antiseros desecados mencionados anteriormente, se depositan 10 µl de disolución de magnetización, a los que se añaden 30 µl de suspensión globular al 1%.

Al mismo tiempo que la prueba directa, se lleva a cabo la prueba de Simonin en los pocillos adyacentes no utilizados: 10 µl de una disolución de magnetización que contiene perlas magnéticas acopladas con anticuerpo anti-GPA se depositan por tanto en los 4 pocillos no utilizados, luego 15 µl de una suspensión de glóbulos rojos de prueba, de grupo sanguíneo conocido tal como del grupo A1, A2, B u O, previamente diluidos al 1% en un tampón de almacenamiento de baja fuerza iónica, se añaden a las perlas y finalmente se añaden 25 µl de plasma del paciente o donante que va a fenotiparse.

Los componentes se homogeneizan colocando la microplaca sobre un agitador de microplacas automático. La velocidad de agitación puede variar entre 500 y 800 rpm, preferentemente entre 650 y 750 rpm, preferentemente a 700 rpm. La duración de la agitación puede variar entre 1 min y 2 min con una preferencia por 1 min 30 s.

La microplaca se incuba entonces entre 2 min y 15 minutos con una preferencia por 10 minutos a temperatura ambiente.

Al ser cada anticuerpo específico para un antígeno, la unión de uno no impide la unión del otro. Por tanto los glóbulos rojos que llevan los antígenos eritrocitarios podrían tanto magnetizarse mediante las perlas anti-GPA como sensibilizarse mediante los antiseros desecados en los pocillos.

Al final de la etapa de incubación, la microplaca se pone sobre una placa con 96 imanes que se ajustan perfectamente en cada pocillo de la microplaca. Bajo la influencia del campo magnético, los glóbulos rojos sensibilizados y magnetizados a través del anticuerpo anti-GPA se atraerán en el fondo de los pocillos y formarán un sedimento si está presente el antígeno correspondiente al antisuero. La duración de la magnetización puede variar entre 3 min y 7 min, con una preferencia por 5 minutos a temperatura ambiente.

La microplaca se coloca entonces sobre un agitador para suspender los glóbulos rojos no aglutinados, es decir RBC que son negativos para el antígeno examinado. La secuencia de agitaciones permite tanto la resuspensión de glóbulos rojos no aglutinados como la visualización de aglutinados de glóbulos rojos tal como sigue: la primera agitación bastante fuerte arranca los glóbulos rojos empaquetados del fondo de los pocillos tras la magnetización. Esta agitación se lleva a cabo durante de 1 a 2 min 30 s a una velocidad que está comprendida entre 800 y 1000 rpm, preferentemente 1 min 45 s a 900 rpm. Al final de la agitación, los glóbulos rojos no aglutinados se dispersan formando una suspensión homogénea, mientras que los glóbulos rojos que expresan el antígeno examinado forman un aglutinado compacto.

No obstante, para los antígenos más ligeramente expresados, los aglutinados formados son más pequeños y están más dispersados al final de la agitación, requiriendo una denominada agitación de “recogida” que ensamblará todos los aglutinados dispersados pequeños formando por tanto un aglutinado completo, claramente definido en el fondo del pocillo. Esta denominada agitación de “recogida” se realiza a baja velocidad, es decir a entre 350 y 550 rpm durante de 30 s a 1 min, preferentemente 450 rpm durante 45 s. Esta agitación de “recogida” no presenta efecto sobre los glóbulos rojos negativos o sobre los aglutinados fuertes. La microplaca puede entonces leerse a simple vista o mediante un lector automático equipado con una cámara.

Una reacción positiva conducirá a la presencia de uno o varios aglutinados en el fondo de los pocillos, mientras que una reacción negativa conducirá a una suspensión homogénea de glóbulos rojos.

Ejemplo 10: Microplaca de tipo DUOLYS, que permite llevar a cabo pruebas de agrupación de ABO y fenotipado de Rh-K en 8 pacientes, incluyendo las pruebas la prueba de Simonin con glóbulos rojos de prueba A1 y B.

A) Reactivos:

- Microplaca DuoLys que contiene los anticuerpos secos del grupo
- un frasco de disolución de magnetización que contiene perlas magnéticas junto con anticuerpo anti-GPA y diluida al 0.004% en un tampón fosfato 0.3 M + BSA al 0.1% (p/v) + synperonic™ al 0.5% (p/v) PE/F68
- una suspensión de glóbulos rojos de prueba del grupo A1 diluidos al 1% en un tampón de almacenamiento
- una suspensión de glóbulos rojos de prueba del grupo B diluidos al 1% en un tampón de almacenamiento
- 8 muestras de sangre de pacientes recogidas con anticoagulante de EDTA

B) Protocolo: para cada muestra de sangre

- Depositar 10 µl de disolución de magnetización en cada pocillo 1 a 12.
- En los pocillos 1 a 10: depositar 30 µl de suspensión globular al 1% llevada a cabo en Liss.
- En la columna 11: depositar 5 µl de suspensión de glóbulos rojos de prueba del grupo A1.
- En la columna 12: depositar 5 µl de suspensión de glóbulos rojos de prueba del grupo B.
- En los pocillos 11 y 12: depositar 25 µl de plasma de cada paciente.
- Remover la microplaca durante 1 minuto y 30 s a 700 rpm.
- Incubar la microplaca a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Magnetizar la microplaca en una placa de imanes durante 5 minutos.
- Agitaciones: 1 min 45 s a 900 rpm + 45 s a 450 rpm.
- Leer a simple vista y por medio de una cámara.

C) Resultados (ver la figura 13)

Los resultados obtenidos en este método de magnetización utilizando perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo específico para glóbulos rojos pueden demostrar claramente la capacidad de determinar el grupo sanguíneo y el fenotipo Rh-K, incluyendo la prueba inversa (prueba de Simonin), en caso de antisueros secados.

Ejemplo 11: Fenotipado sanguíneo, método utilizando anticuerpos de tipo IgG y/o IgM, técnica mediante aglutinación.

La presente invención asimismo permite llevar a cabo una agrupación/fenotipado de glóbulos rojos a partir de una prueba de IgG y/o IgM en forma líquida. Cuando el antisuero es del tipo IgG, se prepara un reactivo “aglutinante” a partir de una anti-inmunoglobulina anti-IgG previamente saturada con una disolución concentrada anti-IgG específica del antígeno buscado.

Este reactivo “aglutinante” líquido se utiliza por tanto durante el fenotipado de sangre tal como cualquier otro

reactivo de fenotipado.

5 Antes de la forma de realización de la prueba, se prepara un reactivo de tipo aglutinante a partir de la incubación de una anti-inmunnoglobulina anti-IgG con un concentrado de anticuerpo monoclonal no purificado que contiene anticuerpos de IgG anti-glóbulos rojos (RBC).

10 Se prepara una suspensión globular entre el 0.5% y el 1.2%, preferentemente el 1% en un tubo o en el pocillo de una microplaca con un fondo redondo, diluyendo 10 µl de glóbulos rojos empaquetados en 1 ml de tampón de baja fuerza iónica, en particular un tampón LISS.

15 En una microplaca de 96 pocillos con fondo redondo, se depositan 10 µl de disolución de magnetización, a los que se añaden 15 µl de suspensión globular al 1% y 25 µl de reactivo "aglutinante" anti-RBC de tipo IgG o IgM.

Los componentes se homogeneizan colocando la microplaca sobre un agitador de microplacas. La velocidad de agitación puede variar de desde 1000 hasta 1200 rpm, con preferencia por 1200 rpm. La duración de la agitación puede variar de desde 5 segundos hasta 1 minuto con una preferencia por 10 segundos.

La microplaca se incuba entonces de 10 min a 30 minutos con preferencia por 20 minutos a 37°C.

20 Al ser cada anticuerpo específico para un antígeno, la unión del primero no impide la unión del otro. Por tanto, los glóbulos rojos que llevan los antígenos eritrocíticos podrían magnetizarse por las perlas anti-GPA así como sensibilizarse por los antisueros de tipo IgM o IgG depositados en el fondo de los pocillos.

25 Al final de la etapa de incubación, la microplaca se coloca sobre una placa que contiene 96 imanes de batería que se ajustan perfectamente por debajo de cada pocillo de la microplaca. Bajo la influencia del campo magnético, los glóbulos rojos que se sensibilizan y magnetizan por medio de anticuerpo anti-GPA se atraerán en el fondo de los pocillos y formarán un aglutinado si está presente el antígeno correspondiente al antisuero. La duración de la magnetización puede variar de desde 5 min hasta 15 min con una preferencia por 10 minutos a temperatura ambiente.

30 Entonces, la microplaca se coloca sobre un agitador de microplacas para permitir la resuspensión de los glóbulos rojos no aglutinados, de ese modo negativos para el antígeno buscado. La secuencia de agitaciones permite tanto la resuspensión de los glóbulos rojos no aglutinados como la visualización de los aglutinados de RBC de la siguiente manera: la primera agitación bastante fuerte arranca los glóbulos rojos empaquetados del fondo de los pocillos después de la magnetización. Esta agitación se realiza durante de 1 a 2 minutos y 30 s a una velocidad de entre 500 y 1000 rpm, con una preferencia por 1 minuto y 30 s a 700 rpm. Al final de la etapa de agitación, los glóbulos rojos no aglutinados se dispersan y forman una suspensión homogénea, mientras que los glóbulos rojos correspondientes al antígeno buscado forman un aglutinado compacto. Para los antígenos menos fuertemente expresados, los aglutinados formados son más pequeños y más dispersos al final de la agitación, lo que requiere una denominada agitación de "recogida" que ensamblará todos los aglutinados dispersos pequeños formando un aglutinado completo, claramente definido en el fondo del pocillo. Esta denominada agitación de recogida se realiza a baja velocidad, es decir, a una velocidad de entre 350 y 550 rpm durante de 30 s a 1 minuto, con preferencia por una velocidad de 450 rpm durante 45 s. La denominada agitación de recogida no presenta efecto sobre los RBC negativos o los aglutinados fuertes. La microplaca puede entonces leerse a simple vista o mediante un lector automático equipado con una cámara.

A) Reactivos

50 - Un frasco de disolución de magnetización que contiene perlas magnéticas junto con anticuerpo anti-GPA y diluida al 0.005% en un PBS 0.3 M + BSA al 0.1% (p/v) + synperonic PE/F68 al 0.5% (p/v).

- Un frasco de disolución policlonal de anticuerpo anti-Jkb (clon P.143, tipo IgM).

55 - Un frasco de reactivo "aglutinante" anti-S: 1 ml de AGH (concentración = 1,8 mg/ml) + 20 ml de disolución concentrada de anti-S (clon P3S13JS123, tipo IgG).

- Un frasco de reactivo "aglutinante" anti-s: 1 ml de AGH (concentración = 1,8 mg/ml) + 20 ml de disolución concentrada de anticuerpo anti-S (clon P3YAN3, tipo IgG).

60 - 5 muestras de sangre de pacientes recogidas con anticoagulante de EDTA.

B) Protocolo: Para cada muestra de sangre

65 - Depositar 10 µl de disolución de magnetización en 3 pocillos de una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo.

- Añadir en los 3 pocillos mencionados 15 µl de suspensión globular al 1% llevada a cabo en Liss.
- Añadir 25 µl de reactivo anti-Jkb, anti-S y anti-s en cada uno de los 3 pocillos.
- 5 - Remover la microplaca durante 10 segundos a 1200 rpm.
- Incubar la microplaca a 37°C durante 20 minutos.
- Magnetizar la microplaca en una placa de imanes durante 10 minutos.
- 10 - Agitación: 1 min 30 s a 700 rpm + 45 s a 450 rpm.
- Lectura a simple vista y con una cámara.

15 C) Resultados: Ver la figura 14

Los resultados obtenidos en este método de magnetización utilizando perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo específico para glóbulos rojos pueden demostrar claramente la capacidad para determinar el fenotipo extendido de donantes o pacientes, en diferentes sistemas sanguíneos.

20 **Ejemplo 12: Fenotipado extendido de 8 donantes: utilización de anti-sueros anti-Fya, anti-Fyb, anti-Jka, anti-Jkb, anti-S y anti-s utilizando el método de técnica de inmunoadherencia**

A) Reactivos:

- 25 - Diluyente hecho de un polímero a base de azúcar y un tampón de baja fuerza iónica, en el que se diluyen las perlas acopladas con anticuerpo anti-GPA. La concentración de este diluyente que contiene las perlas es del 0,004%.
- 30 - Anticuerpo monoclonal humano anti-Fya (clon DGFYA02, de tipo IgG).
- Anticuerpo policlonal humano anti-Fyb.
- 35 - Anticuerpo monoclonal humano anti-Jka (clon P3HT7, de tipo IgM).
- Anticuerpo monoclonal humano anti-Jkb (clon P.143, de tipo IgM).
- Anticuerpo monoclonal humano anti-S (clon, P3S13JS123, de tipo IgG).
- 40 - Anticuerpo monoclonal humano anti-s (clon, P3YAN3, de tipo IgG).
- Control negativo.
- Nanolys.
- 45 - 8 muestras de sangre de donantes recogidas con anticoagulante de tipo EDTA.

B) Protocolo: Para cada donante

50 Antes de las pruebas, las perlas acopladas con anticuerpo anti-GPA se diluyen directamente en el diluyente (asimismo denominado Liss Ficoll).

Los glóbulos rojos de 8 donantes se diluyen al 1% en el diluyente que contiene las perlas acopladas con anticuerpo anti-GPA. Las diferentes suspensiones se llevan a cabo en un tubo o en el pocillo de los 96 pocillos profundos de fondo redondo de una microplaca.

En 7 pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo recubiertos con una mezcla de anticuerpos humanos antiglobulinas de IgG e IgM (anti-IgG) (asimismo denominada CrossLys™) se depositan 50 µl de una barrera viscosa o gel (asimismo denominado Nanolys™). Por encima de Nanolys™, se depositan 55 µl de la suspensión globular al 1% en el diluyente que contiene las perlas. Finalmente, se depositan 10 µl de cada antisuero por encima de la suspensión globular. Entonces se incuba la microplaca durante 20 minutos a 37°C. Al final de la incubación, se coloca la microplaca sobre un agitador equipado con una placa de imanes que se ajustan exactamente por debajo de cada pocillo de la microplaca. Con la aplicación del campo magnético simultáneamente con la agitación, los glóbulos rojos que portan o no anticuerpos irregulares se atraerán a través de la disolución viscosa y se unirán o no a la AHG recubierta sobre el fondo. La agitación final bajo campo magnético consiste en 2 secuencias: la primera secuencia de agitación permite que los glóbulos rojos

magnetizados y sensibilizados se capturen por las antiglobulinas y dura 3 minutos a 500 rpm, mientras que la segunda secuencia de agitación permite formar el negativo reacción por la formación de un sedimento, esta secuencia dura 1 minuto a 600 rpm.

5 En el caso de una reacción positiva, las células magnetizadas sensibilizadas con antisueros se unirán a la AHG y formarán una capa fina de eritrocitos en el fondo del pocillo. En el caso de una reacción negativa, las células magnetizadas sensibilizadas con antisueros formarán un sedimento en el fondo del pocillo.

10 Los resultados esperados se llevaron a cabo en una técnica ya comercializada utilizando las mismas células y el mismo antisuero.

C) Resultados esperados: ver la tabla a continuación

	Fya	Fyb	Jka	Jkb	S	s	CTL
Paciente nº 1	1	1	0	1	0	1	0
Paciente nº 2	1	0	1	1	0	1	0
Paciente nº 3	1	1	1	0	0	1	0
Paciente nº 4	0	0	1	0	1	1	0
Paciente nº 5	1	0	0	1	0	1	0
Paciente nº 6	0	1	0	1	1	1	0
Paciente nº 7	1	1	1	1	0	1	0
Paciente nº 8	0	1	1	1	0	1	0

15 Resultados obtenidos: ver la figura 15

Los resultados obtenidos en este método de magnetización utilizando perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo específico para glóbulos rojos pueden demostrar claramente la capacidad para determinar el fenotipo extendido de donantes o pacientes, en diferentes sistemas sanguíneos.

20 **Ejemplo 13:**

Fenotipado de 48 donantes para el antígeno débil D. Utilización de una mezcla de 2 clones diferentes anti-D (figura 4) utilizando el método de técnica de inmunoadherencia

25 A) Reactivos

- Diluyente hecho de un polímero a base de azúcar y un tampón de baja fuerza iónica, en el que se diluyen las perlas acopladas con anticuerpo anti-GPA. La concentración de este diluyente que contiene las perlas es del 0.004%.
- Mezcla de anticuerpos anti-D (clon ESD1 y clon P3X35).
- Nanolys.
- 48 muestras de sangre de donantes recogidas en anticoagulante de tipo EDTA

B) Protocolo: Para cada donante

40 El protocolo para el fenotipado extendido puede llevarse a cabo, para la prueba de D débil.

C) Resultados esperados: ver la tabla a continuación

	Anti D	Anti D	Anti D	Anti D	Anti D	Anti D
A	D-	D-	D+	D+	D-	Dw tipo
B	Dw tipo 1	D-	D+	D+	D+	DMH
C	D-	D-	D+	D-	D+	D+
D	Dw tipo 3	D+	D+	D+	D+	D+
E	D-	D-	DAU	D+	D+	D+
F	D-	D-	D+	D-	D+	Dw tipo 3
G	D-	D+	D+	Dw tipo 3	D+	D+
H	Dw tipo 3	D-	D VII	D+	D+	D+

45 D) Resultados obtenidos:

Los resultados obtenidos en este método de magnetización utilizando perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo específico para glóbulos rojos pueden demostrar claramente la capacidad para determinar el fenotipo de D débil de los donantes.

5 **Ejemplo 14: Mejora de la sensibilidad y especificidad de las pruebas reduciendo la concentración de anticuerpo anti-GPA acoplado a las partículas magnéticas.**

A) Acoplamiento del anticuerpo anti-glicoforina A a perlas magnéticas con ácido carboxílico de JSR Micro

10 El método preferido de acoplamiento del anticuerpo anti-GPA a las perlas magnéticas con ácido carboxílico de JSR Micro es mediante adsorción física (ref.: Magnospheres MB100).

15 Para aumentar la especificidad y sensibilidad de las pruebas, la concentración de anticuerpo anti-GPA utilizada varía de desde 2 µg hasta 5 µg por mg de perlas con preferencia por 2.5 µg de anticuerpo anti-GPA por mg de perlas.

El acoplamiento de anticuerpo anti-GPA a 5 mg de perlas magnéticas con ácido carboxílico se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 20 - Se lavan 5 mg de partículas magnéticas con ácido carboxílico (es decir, 50 µl de perlas al 10% p/v) dos veces utilizando un imán en 200 µl de tampón MES 50 mM (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), pH 6.2.
- Al final de la etapa de lavado, colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- 25 - Añadir inmediatamente el anticuerpo anti-GPA a una concentración de 2.5 µg por mg de perlas.
- Mezclar concienzudamente agitando con vórtex.
- 30 - Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con una agitación en inclinación lenta o durante 24 horas a 4°C.
- Colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- 35 - Lavar 3 veces las perlas con tampón MES 50 mM pH 6.2 colocando el tubo sobre el imán.
- Al final de la etapa de lavado, resuspender las perlas en un tampón de bloqueo que contiene solución salina de tampón fosfato (PBS) 0.3 M con BSA al 0.5% (p/v).
- 40 - Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con una agitación en inclinación lenta.
- Al final de la etapa de bloqueo, colocar el tubo sobre un imán y eliminar por pipeteo el sobrenadante cuidadosamente una vez que las perlas han migrado al imán y el líquido está transparente.
- 45 - Retirar el tubo del imán y resuspender las perlas con una disolución conservante que contiene PBS 0.3 M con BSA al 0.1% (p/v) y el 5% (p/v) de synperonic™ PE/F68.

50 Para aumentar la estabilidad de las partículas magnéticas acopladas con anticuerpo anti-GPA, se prefiere un almacenamiento con una alta concentración de detergente synperonic™ PE/F68, tal como: 5% (p/v).

La concentración final de las perlas acopladas con anti-glicoforina A es del 1% (p/v) en el tampón conservante. Las perlas se almacenan a 4°C hasta su utilización.

B) Dilución de las perlas acopladas en los diluyentes.

55 Una vez que las perlas están acopladas al anticuerpo anti-GPA, estas se diluyen directamente en el diluyente Liss y Ficoll™ al 2% (p/v), que luego se distribuye encima de la disolución viscosa o gel. La concentración de las perlas en el diluyente puede variar entre el 0.005% y el 0.02%, con preferencia por el 0.007% ± 0.001% (p/v).

60 **Ejemplo 15: Estudio comparativo en la prueba cruzada (prueba de compatibilidad) realizada en donantes de glóbulos rojos del grupo O que muestra un aumento de la sensibilidad y especificidad reduciendo la concentración de anticuerpo anti-GPA acoplado a las partículas magnéticas (ver la figura 17).**

65 Los glóbulos rojos del grupo O de donantes conservados en bolsas de sangre con sag-manitol se someten a prueba frente al plasma o suero de pacientes que es probable que contengan o no anticuerpos irregulares anti-

eritrocitos o frente a diferentes diluciones de antisuero de especificidades conocidas.

La prueba consiste en un estudio comparativo entre 2 concentraciones diferentes de anticuerpo anti-GPA acoplado a las perlas magnéticas y diluidas en el diluyente final al 0.007%.

5

Los resultados se presentan a continuación.

Protocolo:

10

A partir del donante de tubo primario, se diluyen 10 µl de glóbulos rojos empaquetados en 1 ml de tampón de baja fuerza iónica, para preparar una suspensión de eritrocitos al 1%.

15

En los pocillos de una CrossLys™ (placa recubierta con un 2 anticuerpos humanos anti-globulina (anti-IgG)) se depositan 50 µl de Nanolys™, y luego se añaden 50 µl de Liss Ficoll que contiene perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA sobre el Nanolys™. Se añaden 15 µl de glóbulos rojos diluidos hasta el 1% y finalmente se añaden 15 µl del plasma o suero del paciente que va a transfundirse. Entonces se incuba la placa a 37°C durante 20 minutos, y luego se coloca sobre un agitador equipado con una placa de imanes que se ajustan exactamente por debajo de cada pocillo de la microplaca. La agitación final bajo campo magnético consiste en 2 secuencias: 3 minutos a 500 rpm seguido por 2 min a 600 rpm.

20

El estudio comparativo entre las 2 concentraciones de anticuerpo anti-GPA acoplado a partículas magnéticas muestra un aumento del tamaño de la reacción positiva cuando la concentración de anticuerpo anti-GPA acoplado es baja. Al mismo tiempo, las reacciones negativas son más específicas y más discriminantes cuando esta concentración asimismo es baja (es decir, 2.5 µg/mg de partículas magnéticas).

25

Ejemplo 16: Estudio comparativo que muestra un aumento de la estabilidad de las partículas magnéticas cuando se almacenan con alta concentración de detergente no iónico: synperonic™ PE/F68

30

Estudio realizado en una prueba cruzada en donantes de glóbulos rojos del grupo O (ver la figura 18).

Los glóbulos rojos del grupo O de donantes conservados en bolsas de sangre con sag-manitol se someten a prueba frente al plasma o suero de pacientes que es probable que contenga o no anticuerpos irregulares anti-eritrocitos o frente a diferentes diluciones de antisuero de especificidades conocidas.

35

La prueba consiste en un estudio comparativo entre 2 condiciones de almacenamiento diferentes de partículas magnéticas acopladas antes de diluirse en la disolución final.

Los resultados se presentan a continuación.

40

Protocolo:

A partir del donante de tubo primario, se diluyen 10 µl de glóbulos rojos empaquetados en 1 ml de tampón de baja fuerza iónica, para preparar una suspensión de eritrocitos al 1%.

45

En los pocillos de una CrossLys™ (placa recubierta con un 2 anticuerpos humanos anti-globulina (anti-IgG)) se depositan 50 µl de Nanolys™, y luego se añaden 50 µl de Liss Ficoll que contiene perlas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-GPA sobre el Nanolys™. Se añaden 15 µl de glóbulos rojos diluidos hasta el 1% y finalmente se añaden 15 µl del plasma o suero del paciente que va a transfundirse. Entonces se incuba la placa a 37°C durante 20 minutos, y luego se coloca sobre un agitador equipado con una placa de imanes que se ajustan exactamente por debajo de cada pocillo de la microplaca. La agitación final bajo campo magnético consiste en 2 secuencias: 3 minutos a 500 rpm seguido por 2 min a 600 rpm.

50

El estudio de estabilidad entre estas 2 condiciones de almacenamiento, es decir, con el 0.5% o el 5% de detergente synperonic muestra una mejor estabilidad de las perlas cuando se almacenan con el 5% de synperonic antes de su dilución en la disolución final. Esto se demuestra claramente a 37°C, donde en el caso de las perlas almacenadas con el 5% de synperonic, las reacciones positivas y negativas son similares a las mismas perlas almacenadas a 4°C. Mientras que cuando las perlas acopladas se almacenan con solo el 0.5% de synperonic, existe una degradación de todas las reacciones a 37°C.

55

REIVINDICACIONES

1. Método para la demostración de un complejo específico formado haciendo reaccionar un anticuerpo anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo presente en una disolución, y un antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo portado por un eritrocito, estando unido dicho eritrocito a una partícula magnética, teniendo lugar la reacción en un reactor con una parte superior abierta y una base sellada cuyo diámetro disminuye por lo menos en la zona próxima a la base de tal manera que forma una pared inclinada que está por lo menos parcialmente recubierta con un anti-inmunoglobulina o con cualquier otro compuesto apto para unirse al anticuerpo de dicho complejo formado, consistiendo dicho método en varias etapas:
- a) antes del contacto entre la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y la disolución que contiene probablemente anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo:
- llenar el reactor con una disolución viscosa de manera que se cubra por lo menos parte de la pared inclinada del reactor,
- b) poner en contacto, por encima de la disolución viscosa contenida en el reactor, la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo con la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos;
- c) incubar el reactor durante un tiempo dado necesario para la formación del complejo entre las partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo que es probable que estén contenidos en la disolución y para reconocer específicamente dichos antígenos de grupo o fenotipo sanguíneo portados por los eritrocitos;
- d) aplicar un campo magnético a dicho reactor y remover el reactor, de manera que las partículas magnéticas son atraídas hacia el fondo y/o la pared inclinada del reactor; y
- e) leer a simple vista y/o con cualquier otro sistema de lectura apropiado, la imagen obtenida en el fondo del reactor y/o sobre la pared inclinada del reactor recubierta con dicha anti-inmunoglobulina o con cualquier otro compuesto apto para unirse al anticuerpo, haciendo posible esta imagen obtenida demostrar la presencia o no de la formación de un complejo específico anticuerpo/antígeno de grupo o fenotipo humano, caracterizado por que dichas partículas magnéticas que llevan los eritrocitos son partículas magnéticas que se han recubierto previamente con un anticuerpo anti-glicoforina A (anti-GPA) y por que dicho eritrocito está unido a dicha partícula magnética mediante una interacción de tipo anticuerpo/antígeno.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que antes del contacto de la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos con la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo, dicha suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos está en suspensión en un diluyente cuya densidad es superior a 1 e inferior a la densidad de dicha disolución viscosa.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que dichas etapas a) y b) son las siguientes:
- a) antes del contacto de la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos con la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo humano:
- i) preparar la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos fuera de dicho reactor,
 - ii) llenar el reactor con una disolución viscosa de manera que se cubra por lo menos parte de la pared inclinada del reactor, a continuación con dicho diluyente;
- b) poner en contacto por encima del diluyente la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos preparada en la etapa a)i) con la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo.
4. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que dichas etapas a) y b) son las siguientes:
- a) antes del contacto de la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos con la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo humano:
- llenar el reactor con una disolución viscosa de manera que se cubra por lo menos parte de la pared inclinada del reactor, a continuación con dicho diluyente, a continuación con la suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anti-GPA a continuación con la suspensión de eritrocitos;
- b) poner en contacto en el reactor la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo con la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos formada o en formación.

5. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que dichas etapas a) y b) son las siguientes:

a) antes del contacto de la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos con la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo humano:

i) preparar fuera de dicho reactor una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anti-GPA, estando dichas partículas magnéticas en suspensión en dicho diluyente, o la disponibilidad de tal suspensión ya preparada,

ii) llenar el reactor con una disolución viscosa de manera que se cubra por lo menos parte de la pared inclinada del reactor, a continuación con la suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anti-GPA en dicho diluyente preparado en la etapa a)i), a continuación con la suspensión de eritrocitos;

b) poner en contacto en el reactor la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo con la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos formada o en formación.

6. Método según la reivindicación 5, en una forma de realización automatizada preferida como parte de una automatización de la distribución por un autómatas de laboratorio, caracterizado por que dichas etapas a) y b) son las siguientes:

a) antes del contacto de la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos con la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo humano:

i) preparar fuera de dicho reactor una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anti-GPA, estando dichas partículas magnéticas en suspensión en dicho diluyente, o la disponibilidad de tal suspensión ya preparada,

ii) llenar el reactor con una suspensión de eritrocitos, a continuación con una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anti-GPA en dicho diluyente preparado en la etapa a)i);

b) poner en contacto en el reactor la disolución que contiene o es probable que contenga dicho anticuerpo con la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos formada o en formación.

7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el reactor es una cúpula de microplaca con un fondo de forma redonda o en forma de V.

8. Método según la reivindicación 1 a 7, para pruebas de anticuerpos irregulares (IAT) en un suero o plasma humano, caracterizado por que incluye una etapa en la que los eritrocitos portados por las perlas magnéticas son eritrocitos de grupo O.

9. Método para la agrupación y/o el fenotipado de sangre, en el que dicho método comprende las etapas de:

a) preparar una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anti-GPA, estando dichas partículas magnéticas en suspensión en un diluyente o la disponibilidad de tal suspensión ya preparada,

b)

i) poner en contacto la suspensión de dichas partículas magnéticas recubiertas con anti-GPA con una suspensión de eritrocitos para los que se desea determinar el fenotipo y/o grupo sanguíneo,

ii) poner en contacto en un reactor la suspensión de partículas magnéticas que llevan los eritrocitos formada o en formación en la etapa b) con una prueba sérica que contiene anticuerpo de especificidad de grupo/fenotipo sanguíneo conocida,

iii) agitar o remover,

c) incubar el reactor durante un tiempo dado necesario para la formación del complejo entre las partículas magnéticas que llevan los eritrocitos y la prueba sérica;

d) aplicar un campo magnético a dicho reactor y remover el reactor, de manera que las partículas magnéticas son atraídas hacia el fondo y/o la pared inclinada del reactor; y

e) leer a simple vista y/o con cualquier otro sistema de lectura apropiado, la imagen obtenida en el fondo del reactor y/o sobre la pared inclinada del reactor, haciendo posible esta imagen obtenida demostrar la presencia o no de la formación de un complejo específico anticuerpo/antígeno de grupo o fenotipo humano.

10. Método para la agrupación y/o el fenotipado de sangre según la reivindicación 9, en el que:
- en la etapa d), se aplica un campo magnético a dicho reactor con una etapa de remover, de manera que las partículas magnéticas son atraídas hacia el fondo del reactor; y
 - en la etapa e), la lectura a simple vista y/o con cualquier otro sistema de lectura apropiado de una reacción de aglutinación obtenida o no en el fondo del reactor, demostrando esta aglutinación específica la presencia de la formación de un complejo específico anticuerpo/antígeno de grupo o fenotipo humano.
11. Método según una de las reivindicaciones 1 a 8, para la agrupación y/o el fenotipado de sangre, en el que la disolución que es probable que contenga los anticuerpos anti-antígeno de grupo o fenotipo humano es una prueba sérica que contiene anticuerpo de especificidad de grupo/fenotipo sanguíneo conocida.
12. Método según las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que el anticuerpo anti-GPA es un anticuerpo de mamífero, preferentemente de origen murino o humano, y apto para reconocer específicamente la glicoforina A humana portada por los eritrocitos, preferentemente dirigido contra la sialoglicoproteína glicoforina A, preferentemente contra su dominio extramembranoso.
13. Kit para la agrupación y/o el fenotipado de sangre caracterizado por que incluye:
- a) un reactivo que contiene una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anti-GPA,
 - b) una prueba sérica que contiene anticuerpo de especificidad de grupo/fenotipo sanguíneo conocida, en disolución o en una forma secada.
14. Kit para la demostración de un complejo específico formado por la reacción entre un anticuerpo anti-antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo, presente en una disolución y un antígeno de grupo o fenotipo sanguíneo portado por un eritrocito, caracterizado por que incluye:
- a) un reactivo que contiene una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con anti-GPA, en el diluyente como se define en el método según las reivindicaciones 2 a 12
 - b) un reactor o un conjunto de reactores con una parte superior abierta y una base sellada y cuyo diámetro disminuye por lo menos en la zona próxima a la base para formar una pared inclinada que se extiende hacia abajo hasta la base, estando dicha pared inclinada por lo menos parcialmente recubierta con un anti-inmunoglobulina o con cualquier otro compuesto apto para unirse al anticuerpo de dicho complejo formado, y
 - c) una suspensión de eritrocitos de prueba de fenotipo conocido para acoplarse a dichas partículas magnéticas.

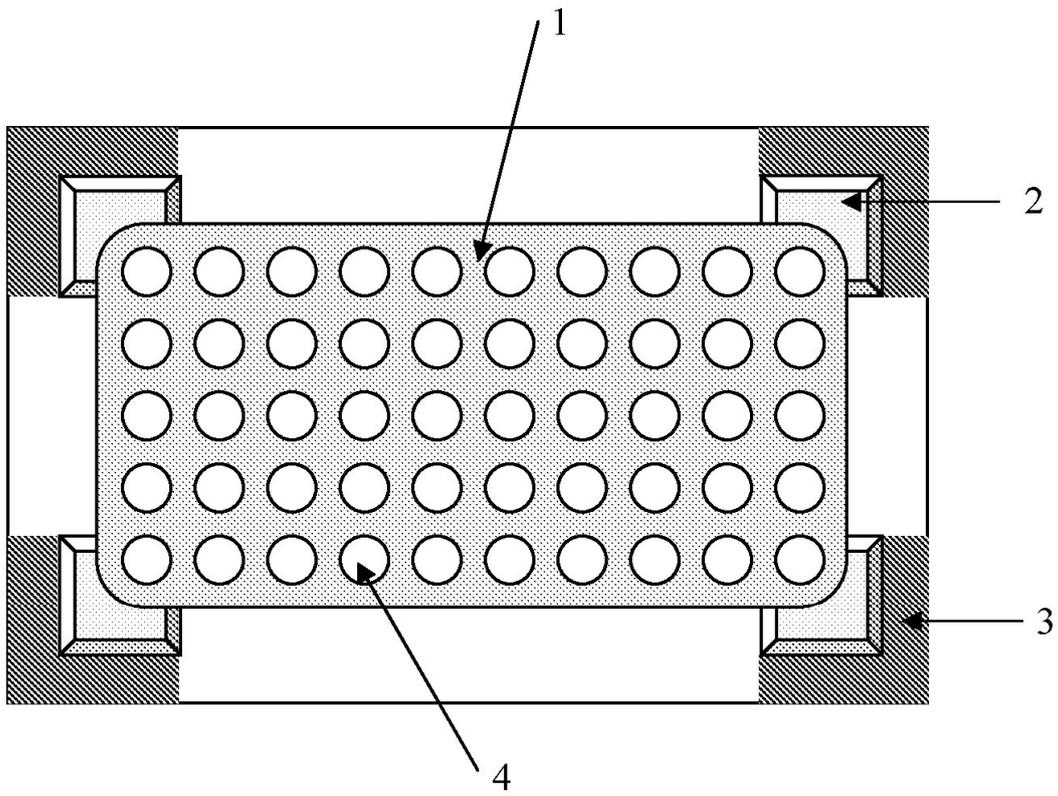


FIGURA 1A

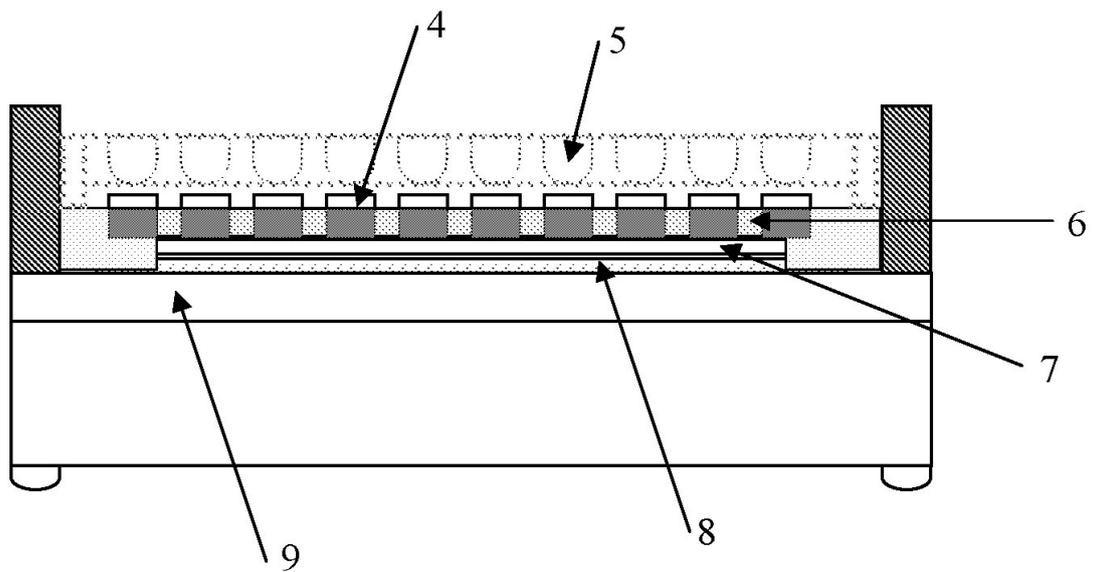


FIGURA 1B

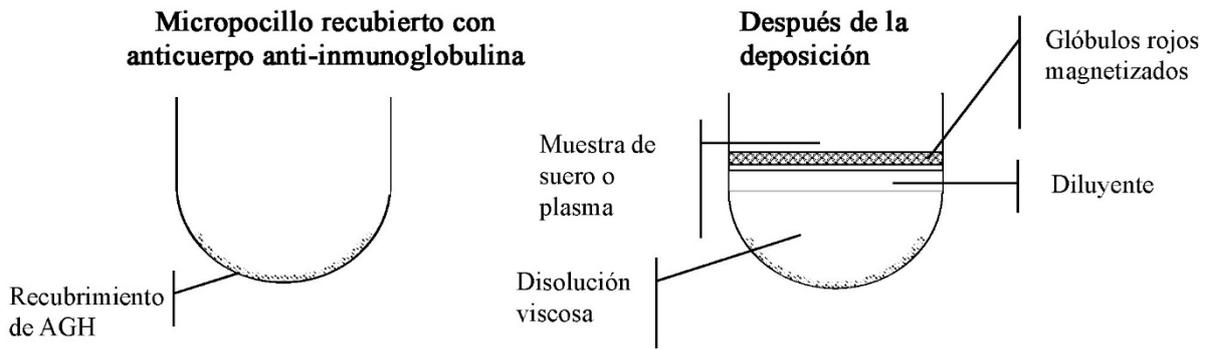
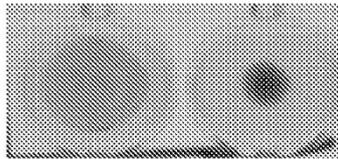


FIGURA 2A

FIGURA 2B



Reacción positiva

Reacción negativa

FIGURA 3

	Anti-D,C,E 1/2	Anti-D,C,E 1/4	Anti-D,C,E 1/8	Anti-D,C,E 1/16	Anti-D,C,E 1/32	Anti-D,C,E 1/64	Anti-D,C,E 1/128	Plasma AB
Resultados esperados	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	Neg
Resultados obtenidos en el panel de RBC O								
Resultados obtenidos en el paciente con RBC O								

FIGURA 4

Anti-D	RBC O1 (R1R1)	RBC O2 (R2R2)	RBC O3 (rr)
Anti-D 20 ng/ml			
Anti-D 10 ng/ml			
Anti-D 5 ng/ml			
Anti-D 2,5 ng/ml			
Anti-D 1,25 ng/ml			
Negativo			

FIGURA 5

Plasma o suero del paciente	Donante de RBC	Resultados esperados	Resultados obtenidos	Compatibilidad
Anti- D+C+E	O (DCee)	3+		Incompatibilidad
	O (DCcEe)	3+		Incompatibilidad
Anti-K	O (DCee)	Neg		Compatibilidad
	O (DCcEe)	Neg		Compatibilidad
Anti-E	O (DCee)	Neg		Compatibilidad
	O (DCcEe)	1+		Incompatibilidad
AntiJka	O (DCee)	Neg		Compatibilidad
	O (DCcEe)	1+		Incompatibilidad

FIGURA 6

Plasma o suero del paciente	Donante de RBC	Resultados esperados	Resultados obtenidos	Compatibilidad
Paciente n.º1	O 1	Neg	*	Compatibilidad
Paciente n.º2	O 2	Neg	*	Compatibilidad
Paciente n.º3	O 3	Neg	*	Compatibilidad
Paciente n.º4	O 4	Neg	*	Compatibilidad
Paciente n.º5	O 5	Neg	*	Compatibilidad
Paciente n.º6	O 6	Neg	*	Compatibilidad
Paciente n.º7	O 7	Neg	*	Compatibilidad
Paciente n.º8	O 8	Neg	*	Compatibilidad

FIGURA 7

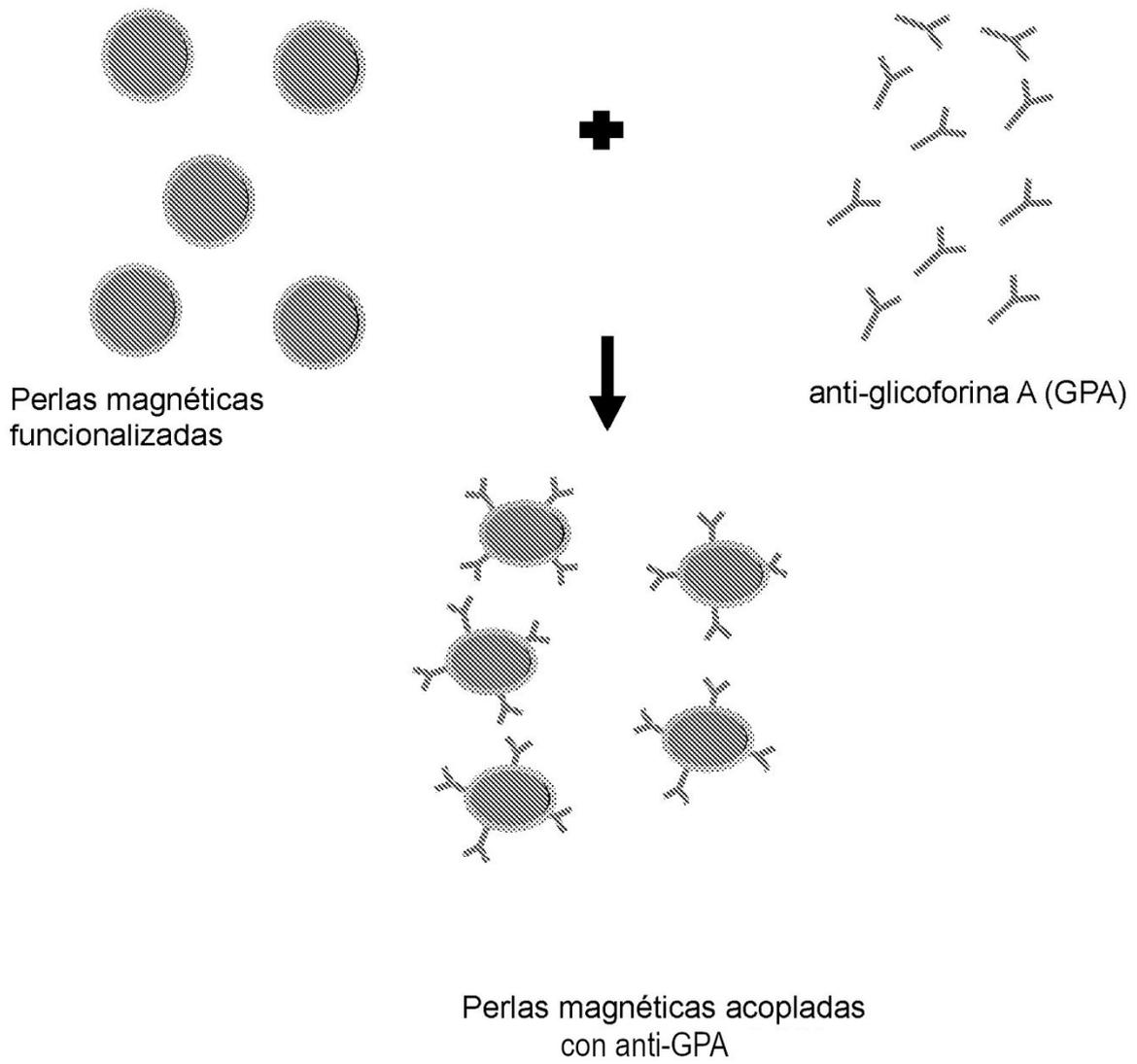


FIGURA 8

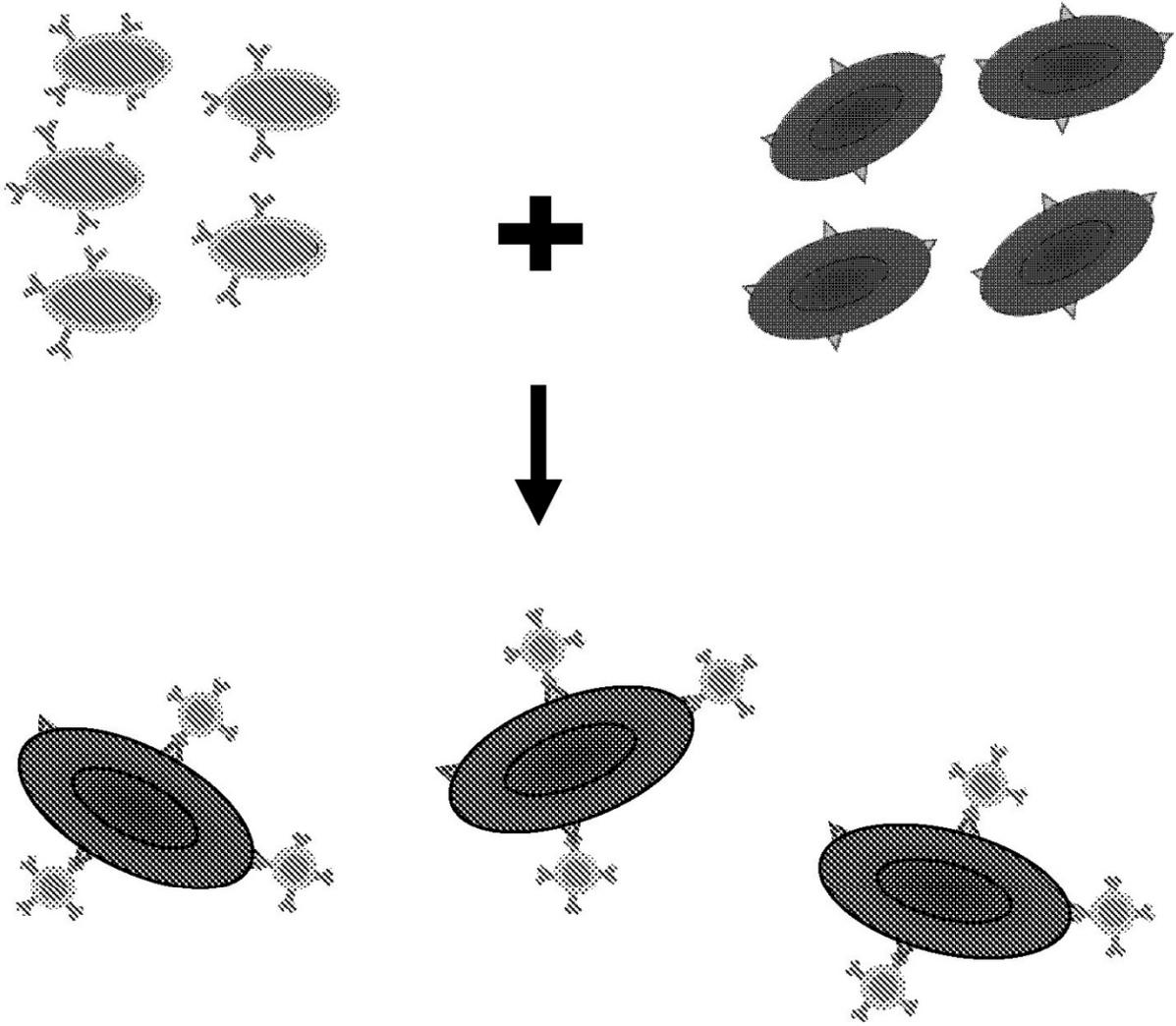
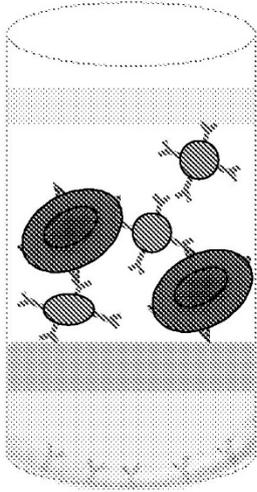


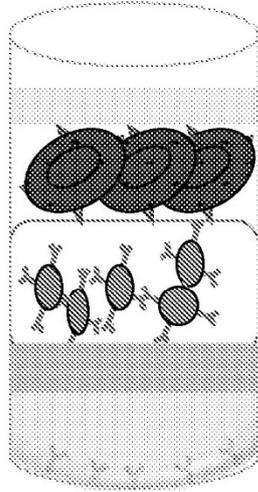
FIGURA 9

FIGURA 10



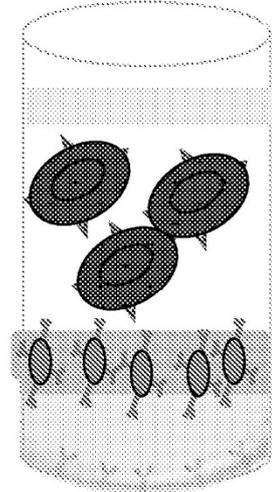
1º método de magnetización

FIGURA 11



2º método de magnetización

FIGURA 12



3º método de magnetización

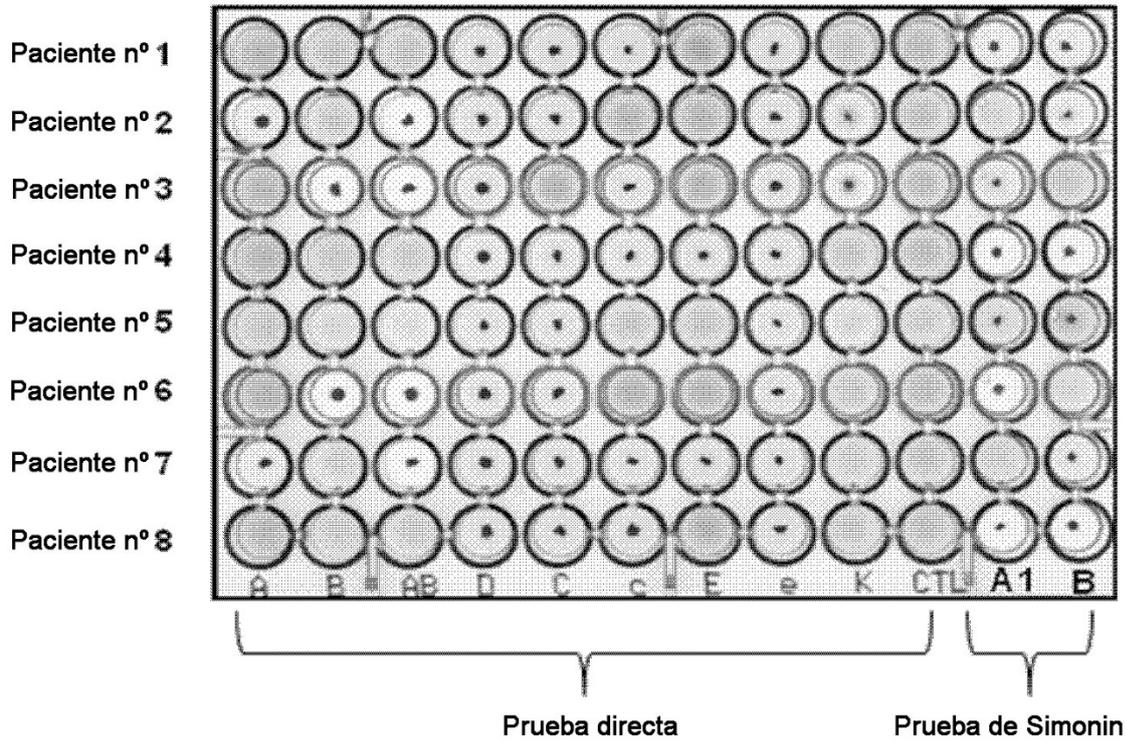


FIGURA 13

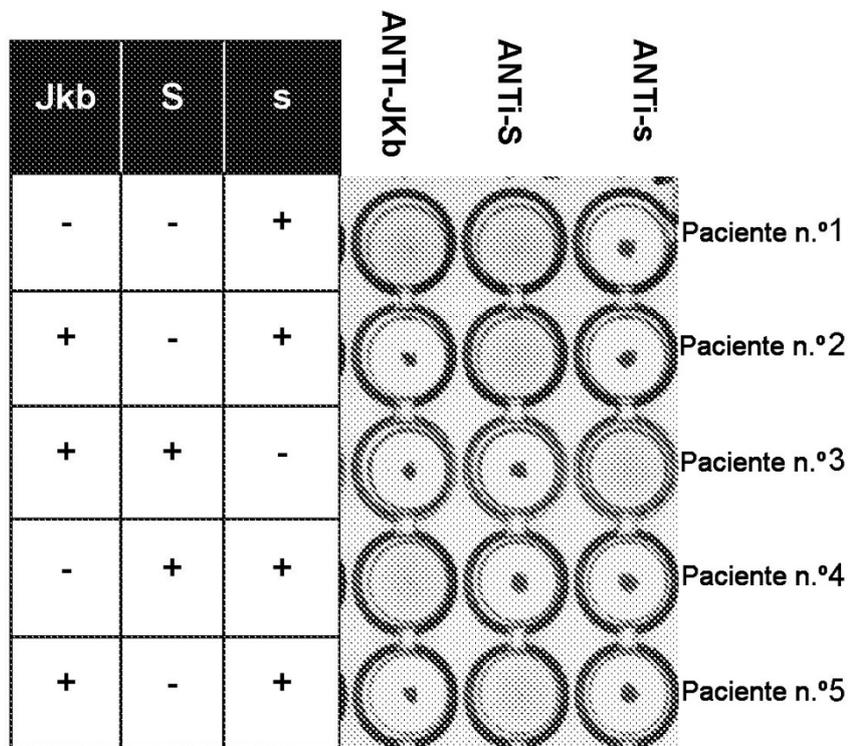


FIGURA 14

	Anti Fya	Anti Fyb	Anti Jka	Anti Jkb	Anti S	Anti s	Ctl
Paciente 1							
Paciente 2							
Paciente 3							
Paciente 4							
Paciente 5							
Paciente 6							
Paciente 7							
Paciente 8							

FIGURA 15

	Anti D					
A						
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						

FIGURA 16

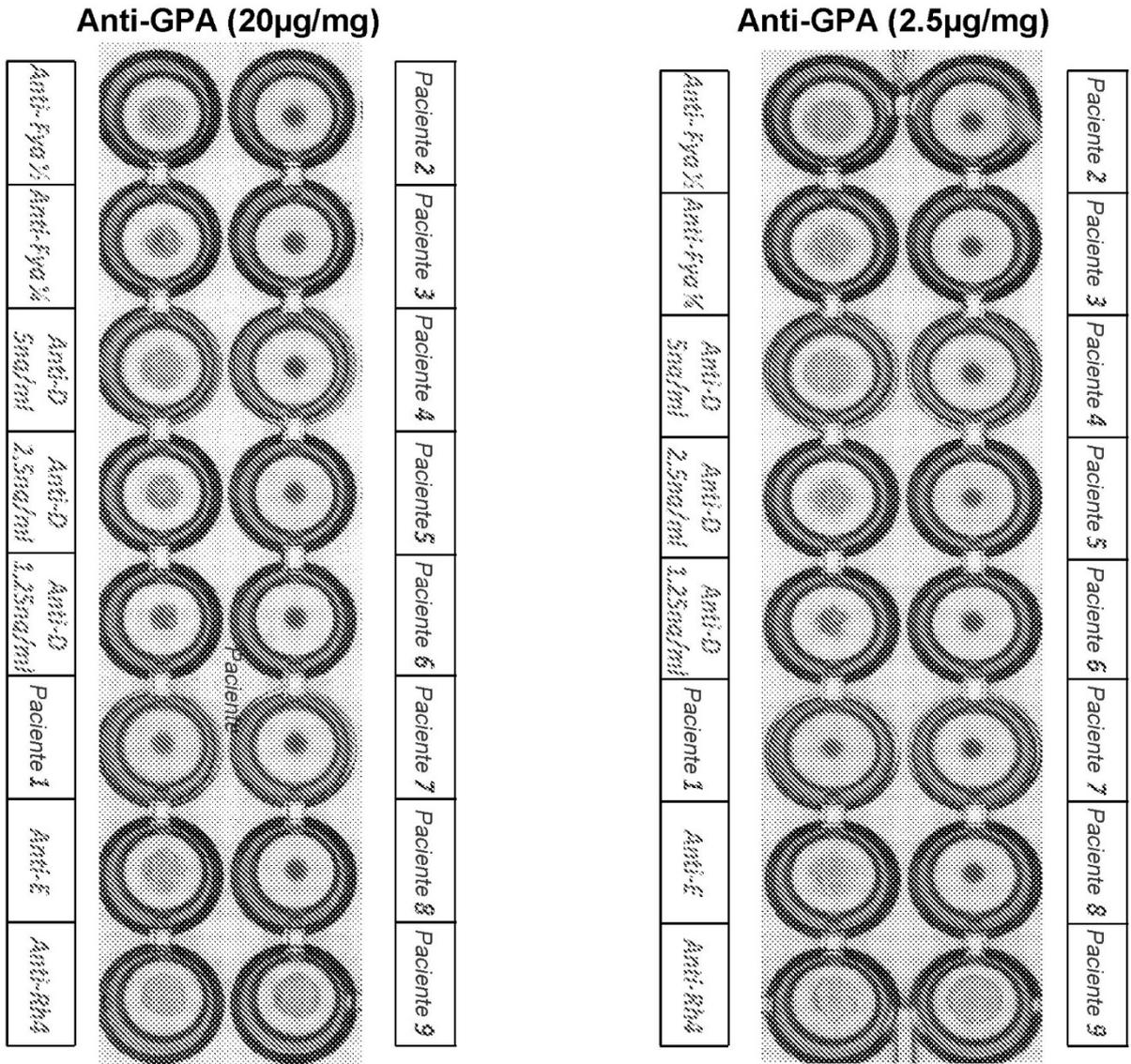


FIGURA 17

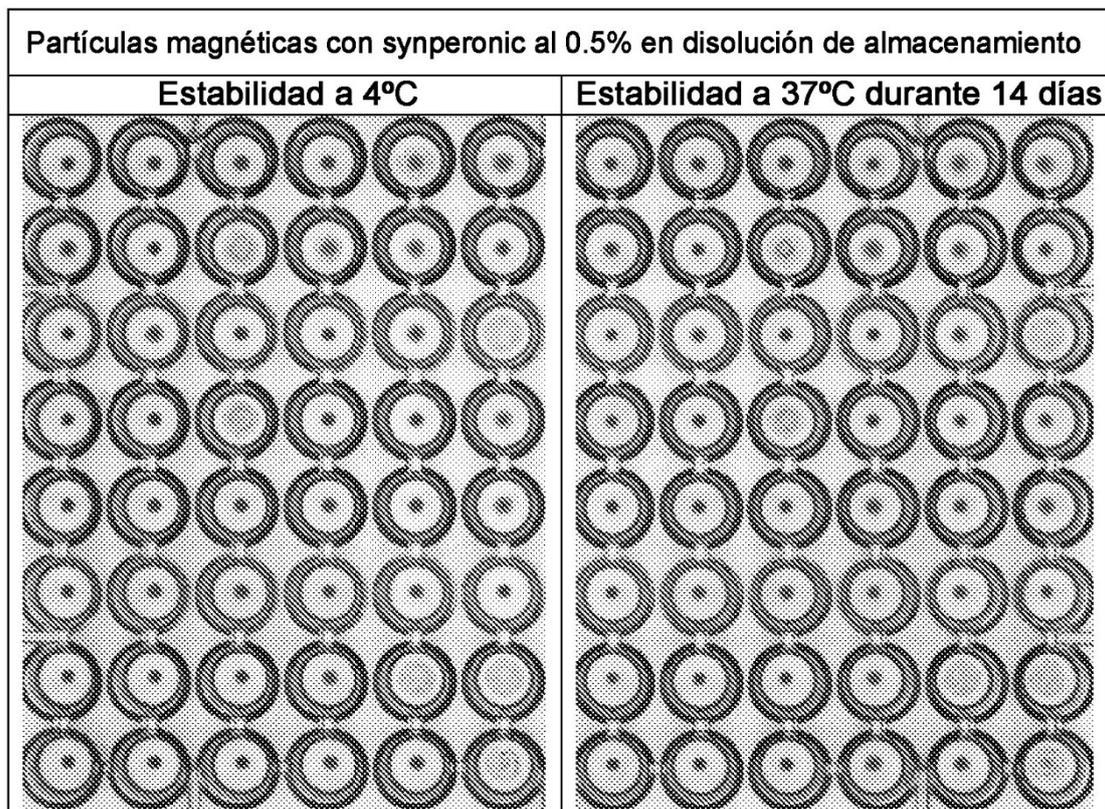
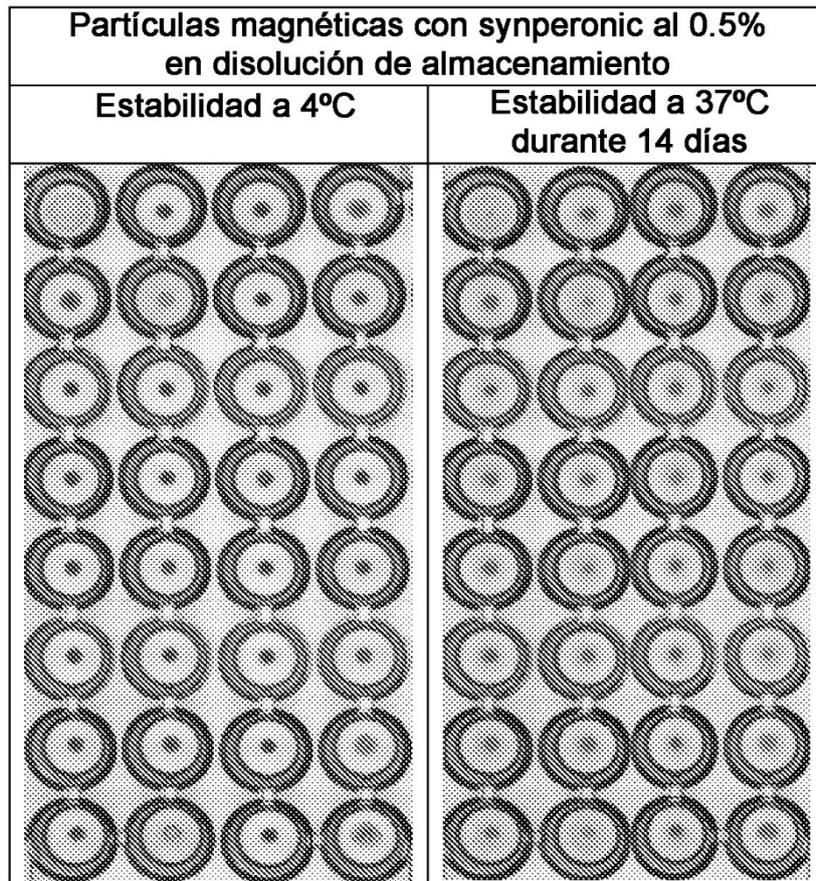


FIGURA 18