



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0023838

(51)⁷ G01N 33/86

(13) B

(21) 1-2014-00089

(22) 15/06/2012

(86) PCT/JP2012/065433 15/06/2012

(87) WO2012/173259 20/12/2012

(30) 2011-135173 17/06/2011 JP

(45) 25/05/2020 386

(43) 25/03/2014 312A

(73) 1. SCHOOL JURIDICAL PERSON HIGASHI-NIPPON-GAKUEN (JP)

1757, Aza Kanazawa, Tobetsu-cho, Ishikari-gun, Hokkaido 0610293, Japan

2. SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (JP)

13-5, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 1030027, Japan

(72) IEKO, Masahiro (JP); MORIKAWA, Chizuru (JP)

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN CHẤT CHỐNG ĐÔNG MÁU LUPUT

(57) Sáng chế đề cập đến sự phát triển của phương pháp phát hiện LA thuận tiện, trong đó thậm chí mẫu được lấy từ người bệnh, là người nhận liệu pháp dùng chất chống đông máu warfarin, heparin hoặc tương tự, không bị ảnh hưởng bởi liệu pháp dùng chất chống đông máu, suy xét từ sự thiếu hụt của yếu tố làm đông máu được tạo khả năng, và huyết tương của người khỏe mạnh không được sử dụng. Phương pháp phát hiện chất chống đông máu luput bao gồm các bước (A), (B) và (C) sau đây: (A) bổ sung chế phẩm dung dịch đậm chứa yếu tố làm đông máu vào từng mẫu máu và mẫu được pha loãng của mẫu máu trước khi đo hoặc ở thời điểm đo thời gian đông máu; (B) đo thời gian đông máu đối với các mẫu khác nhau của bước (A); và (C) so sánh thời gian đông máu đối với các mẫu khác nhau thu được trong bước (B).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện dương tính của chất chống đông máu luput mà được sử dụng trong chẩn đoán hội chứng kháng thể kháng phospholipit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chất chống đông máu luput (lupus anticoagulant - LA) là chất chống đông máu tuần hoàn, được báo cáo lần đầu tiên ở những người bệnh SLE (Systemic Lupus Erythematosus - Luput ban đỏ hệ thống). Trong trường hợp của những người bệnh dương tính với LA, từ quan điểm lâm sàng, tạng chảy máu vừa đủ ghi nhận được, và những người bệnh ưu thế thể hiện tạng huyết khối. Tuy nhiên, trong trường hợp của các mẫu được lấy từ những người bệnh dương tính với LA, khuynh hướng kéo dài của thời gian thromboplastin được hoạt hóa một phần (activated partial thromboplastin time-APTT) hoặc thời gian protrombin (protrombin time-PT) được thể hiện *in vitro*. Từ nghiên cứu tiếp theo, đã làm rõ được rằng LA là tự kháng thể cho các phức của phospholipit có các phần mang điện âm và các protein trong máu như là β 2-glycoprotein I (β 2GPI) hoặc protrombin, và hiện nay được biết rằng LA được phát hiện với lượng lớn thậm chí trong các bệnh khác với SLE. Cụ thể là, tần số xuất hiện là cao trong các điều kiện bệnh học của các bệnh mà nhìn chung là để chỉ "hội chứng kháng phospholipit (APS)", và LA được xem là một trong các khám phá trong phòng thí nghiệm liên quan đến chỉ tiêu chẩn đoán đối với các bệnh (Tài liệu non-patent 1).

LA được xác định là globulin miễn dịch mà ức chế các phản ứng đông máu phụ thuộc phospholipit *in vitro* (APTT, thời gian tạo cục khối kaolin, thời gian pha loãng nọc độc rắn hồ lục của Russell, và tương tự), không ức chế các hoạt tính yếu tố đông máu riêng, và LA không phải là kháng thể đơn. Ví dụ, với một số ví dụ về các kháng thể chịu trách nhiệm về LA, kháng thể phức β 2GPI kháng cardiolipin, kháng thể phức protrombin kháng phosphatidylserin và tương tự đã được tìm ra, và có các hệ thống đo dựa trên phương pháp ELISA. Tuy nhiên, sự tồn tại của các kháng thể chịu trách nhiệm về LA khác với các loại này là không bị phủ nhận, và thậm chí nếu tất cả các kháng thể này đã được biết đến là các kháng thể chịu trách nhiệm là âm tính, còn có các trường hợp trong đó LA trở thành dương tính.

Các chất phản ứng để đo thời gian đông máu chứa phospholipit thường được sử dụng làm các chất phản ứng để phát hiện LA. Khi LA có mặt trong mẫu vật, LA liên kết với phospholipit trong chất phản ứng. Do đó, phospholipit cần thiết để thúc đẩy phản ứng đông máu *in vitro* trở thành thiếu hụt, và thời gian đông máu được kéo dài. Do đó, dương tính LA có thể được xác định dựa trên việc kéo dài thời gian đông máu. Ví dụ về các chất phản ứng để phát hiện LA bao gồm các chất phản ứng đối với APTT, PT, và thời gian pha loãng nọc độc rắn hổ lục của Russell (dRVVT).

Hơn nữa, thử nghiệm điều chỉnh đông máu (dưới đây còn được gọi là "thử nghiệm trộn" hoặc "thử nghiệm hỗn hợp") trong đó chất phản ứng để đo thời gian đông máu chứa phospholipit được sử dụng, huyết tương thông thường được bổ sung vào huyết tương thử nghiệm, và phạm vi thời gian đông máu của huyết tương thử nghiệm được điều chỉnh (được chuẩn hóa) được vẽ đồ thị để xác định nguyên nhân, cũng được tiến hành (Tài liệu non-patent 2).

Chất phản ứng để phân tích dựa trên dRVVT được gọi là Test LA "GRADIPORE" (là sản phẩm của Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) được sử dụng làm chất phản ứng để phát hiện LA có trên thị trường. Với chất phản ứng này, sự có mặt hoặc không có mặt của LA trong mẫu được xác định trên cơ sở của tỷ lệ của thời gian đông máu được lấy bằng cách bổ sung nọc độc rắn hổ lục của Russell và thời gian đông máu được lấy bằng cách bổ sung nọc độc rắn hổ lục của Russell và nồng độ phospholipit dư.

Hơn nữa, ngoài chất phản ứng được mô tả trên đây, chất phản ứng để phát hiện LA được gọi là STACLOT LA (là sản phẩm của Diagnostica Stago, Inc.) cũng có trên thị trường. Với chất phản ứng này, sự có mặt hoặc không có mặt của LA trong mẫu được xác định bằng cách xét nghiệm sự khác biệt về thời gian đông máu đối với APTT giữa mẫu thu được bằng cách bổ sung huyết tương thông thường và phospholipit dư vào huyết tương thử nghiệm, và mẫu thu được bằng cách bổ sung chỉ huyết tương thông thường vào huyết tương thử nghiệm.

Tuy nhiên, trong các phương pháp đã có được mô tả trên đây, khó phân biệt có phải hay không nguyên nhân kéo dài thời gian đông máu đơn giản nằm ở sự thiếu hụt của các yếu tố đông máu, trong các chất ức chế của các yếu tố đông máu, hoặc trong

LA, chỉ bằng cách đo chỉ tiêu đơn sử dụng từng chất trong số các chất phản ứng. Mặt khác, do chiến thuật điều trị có thể biến đổi dựa trên sự khác biệt về nguyên nhân, việc suy xét của nó là quan trọng. Do đó, các phương pháp phát hiện LA này hiếm khi được sử dụng đơn, và nó được đề xuất kết hợp hai hoặc nhiều dạng xét nghiệm và xác định toàn diện các kết quả (Tài liệu non-patent 3).

Tài liệu trong kỹ thuật hiện nay

Tài liệu non-patent

Tài liệu non-patent 1: INTERNATIONAL CONSENSUS STATEMENT ON PRELIMINARY CLASSIFICATION CRITERIA FOR DEFINITE ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME, ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 42, No. 7, July 1999, pp. 1309-1311.

Tài liệu non-patent 2: *Kensa to Gijutsu* (Examination and Technology), Vol. 34, No. 8, August 2006, pp. 735-742

Tài liệu non-patent 3: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7: pp. 1737-1740 (2009)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề sẽ được giải quyết bởi sáng chế

Như được mô tả trên đây, có vấn đề mà để tiến hành phát hiện LA, một vài xét nghiệm được kết hợp tạo ra quy trình phát hiện nặng nề và phức tạp, và phải có kỹ năng thực hiện thậm chí còn phải xử lý các kết quả. Ví dụ, khi việc xác định dương tính hoặc âm tính đưa ra các kết quả khác nhau ở các dạng khác nhau của các phương pháp phát hiện LA, phân tích cân nhắc các nguyên lý của các phương pháp phát hiện khác nhau cần thiết, và việc xác định dương tính hoặc âm tính phải được thực hiện dựa trên khả năng rơi vào âm tính hoặc rơi vào dương tính của các phương pháp phát hiện khác nhau. Do đó, rất khó phân biệt rõ ràng sự có mặt hoặc không có mặt của LA trong các phương pháp phát hiện LA hiện có.

Hơn nữa, nhiều người bệnh dương tính với LA thể hiện triệu chứng huyết khối, và trong nhiều trường hợp, ở thời điểm khi LA bị nghi ngờ và việc xét nghiệm được bắt đầu, những người bệnh có thể đã được nhận liệu pháp dùng chất chống đông máu.

Tuy nhiên, trong trường hợp của các mẫu được lấy từ những người bệnh, là những người đã được nhận liệu pháp dùng chất chống đông máu, được biết rằng rơi vào dương tính có thể xuất hiện trong APTT và dRVVT, trong khi rơi vào âm tính có thể xuất hiện trong thử nghiệm hỗn hợp.

Trong liệu pháp dùng chất chống đông máu, heparin mà cho hiệu quả ở thời điểm khẩn cấp và do đó có thể được sử dụng theo cách dùng vào tĩnh mạch, và trong việc ngăn ngừa dựa trên việc dùng trong thời gian dài, warfarin mà là chất chống đông máu dùng qua đường miệng được sử dụng. Warfarin ngăn chặn tổng hợp sinh học của Yếu tố II (protrombin), Yếu tố VII, Yếu tố IX, và Yếu tố X trong số các yếu tố làm đông máu trong gan bằng cách gây đối kháng tác dụng của vitamin K. Do đó, trong trường hợp của người nhận warfarin, do hoạt tính của các yếu tố đông máu này giảm, APTT, PT hoặc dRVVT được kéo dài rất nhiều bất chấp sự có mặt hoặc không có mặt của LA. Hơn nữa, trong thử nghiệm hỗn hợp, có các trường hợp trong đó những người bệnh được xem là dạng thiếu hụt yếu tố bất chấp sự có mặt hoặc không có mặt của LA. Ngoài ra, do heparin làm hoạt hóa kháng thrombin và làm hoạt hóa tác dụng chống đông máu do đó mà ngăn chặn đông máu, gan kéo dài rất nhiều thời gian đông máu bất chấp sự có mặt hoặc không có mặt của LA.

Do đó, Hiệp hội Huyết khối và Cầm máu quốc tế (International Society on Thrombosis and Haemostasis - ISTH) đề xuất rằng, ở thời điểm phát hiện LA, trong các mẫu được lấy từ những người bệnh dùng warfarin, việc đo được thực hiện sau khi huyết tương thử nghiệm được trộn với lượng tương xứng của huyết tương của người khỏe mạnh để bổ sung các yếu tố đông máu thiếu hụt bất kỳ. Xét đến huyết tương của người khỏe mạnh, huyết tương mà được đưa vào ly tâm kép sao cho số lượng tiểu cầu trong máu nhỏ hơn $10^7/\text{mL}$, và được tạo điều kiện sao cho hoạt tính của tất cả các yếu tố làm đông máu dường như là 100%, được đồng thực hiện trong các phương tiện khác nhau và được sử dụng (Tài liệu non-patent 3). Tuy nhiên, trong số các yếu tố làm đông máu, có các yếu tố mà có hoạt tính rất không ổn định và thiên về được bất hoạt. Do đó, rất khó chuẩn bị huyết tương của người khỏe mạnh này, và có vấn đề là không dễ dàng đạt được ổn định cho nó.

Hơn nữa, trong việc chuẩn bị huyết tương của người khỏe mạnh, do số lượng người mà huyết tương được bảo quản (trong bể) và được trộn tăng lên, các biến đổi riêng về hoạt tính của các yếu tố đông máu có thể được lấy trung bình. Tuy nhiên, số lượng người khỏe mạnh cần thiết không thể được đảm bảo trong một số phương tiện, và sự sai lệch xuất hiện ở các nhà cung cấp huyết tương, có vấn đề là sự khác biệt về chất lượng sản phẩm có thể xuất hiện giữa các bể khác nhau. Hơn nữa, trong phương pháp có sử dụng huyết tương của người khỏe mạnh, không chỉ LA trong huyết tương thử nghiệm được pha loãng, mà cả các chất ức chế việc đo LA có mặt trong huyết tương của người khỏe mạnh (phospholipit, các màng được đập vỡ có nguồn gốc từ tiểu cầu, và tương tự) có thể được kết hợp. Do đó, cụ thể là trong trường hợp khi mà LA là dương tính yếu, có vấn đề là có khả năng phát hiện rơi vào âm tính.

Thậm chí trong quá trình trong đó ngăn chặn được triệu chứng huyết khối bởi liệu pháp dùng chất chống đông máu, suy xét các nguyên nhân đối với triệu chứng huyết khối là quan trọng bởi vì chiến thuật điều trị phụ thuộc vào đó. Hơn nữa, thậm chí trong trường hợp ở đó dương tính LA bắt đầu được phát hiện và liệu pháp dùng chất chống đông máu được bắt đầu, việc giám sát tăng và giảm LA được xem là rất hữu dụng. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có phương pháp nhờ đó việc giám sát được diễn ra thuận tiện.

Do đó, có nhu cầu lớn đối với sự phát triển của phương pháp phát hiện LA thuận tiện trong đó thậm chí đối với mẫu được lấy từ người bệnh, là người nhận liệu pháp dùng chất chống đông máu sử dụng warfarin hoặc heparin, suy xét từ sự thiếu hụt của yếu tố làm đông máu có thể được đạt tới không bị ảnh hưởng bởi liệu pháp dùng chất chống đông máu, và huyết tương của người khỏe mạnh không được sử dụng.

Phương pháp giải quyết vấn đề

Do đó, các tác giả sáng chế đã tiến hành các điều tra khác nhau để giải quyết các vấn đề được mô tả trên đây, và kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng khi mẫu máu và mẫu được pha loãng của nó được chuẩn bị, chế phẩm dung dịch đệm chứa yếu tố làm đông máu (dưới đây còn được gọi là chất phản ứng phụ trợ) được bổ sung vào từng mẫu trong số các mẫu trước khi đo hoặc ở thời điểm đo thời gian đông máu của từng mẫu trong số các mẫu, thời gian đông máu được đo đối với từng mẫu

trong số các mẫu, và thời gian đông máu đối với các mẫu đó được so sánh, LA có thể được phát hiện với mức nhạy cảm và đặc hiệu thỏa đáng hơn so với các phương pháp thông thường, không bị ảnh hưởng bởi liệu pháp dùng chất chống đông máu. Do đó, các tác giả sáng chế đã hoàn thiện sáng chế.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện chất chống đông máu luput, phương pháp bao gồm các các bước (A), (B) và (C) sau đây:

(A) bổ sung chế phẩm dung dịch đậm chứa yếu tố làm đông máu vào từng mẫu máu trong số các mẫu máu và mẫu được pha loãng của mẫu máu trước khi đo hoặc ở thời điểm đo thời gian đông máu;

(B) đo thời gian đông máu đối với các mẫu khác nhau của bước (A); và

(C) so sánh thời gian đông máu đối với các mẫu khác nhau thu được trong bước (B), như được xác định trong điểm 1 yêu cầu bảo hộ.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, thậm chí đối với mẫu được lấy từ người bệnh, là người nhận liệu pháp dùng chất chống đông máu sử dụng warfarin, heparin hoặc tương tự, sự có mặt hoặc không có mặt của LA có thể được khẳng định cụ thể là thuận tiện với nhạy cảm cao hơn so với các phương pháp thông thường, không bị ảnh hưởng bởi liệu pháp dùng chất chống đông máu. Do đó, không cần thiết quan tâm xem người bệnh có nhận liệu pháp dùng chất chống đông máu hay không. Ngoài ra, do không cần thiết chuẩn bị huyết tương của người khỏe mạnh để đo thời gian đông máu nhằm phát hiện LA, các vấn đề về sự khác biệt giữa các bể khác nhau của huyết tương của người khỏe mạnh, mà thường là có vấn đề, và có thể giải quyết được việc đạt được ổn định.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp phát hiện LA theo sáng chế được đặc trưng bằng việc tiến hành các bước (A), (B) và (C). Cụ thể hơn là, phương pháp phát hiện LA được đặc trưng trong đó mẫu máu và mẫu được pha loãng của mẫu máu (dưới đây còn đơn giản là để chỉ mẫu được pha loãng) được sử dụng làm các mẫu đo, chế phẩm dung dịch đậm chứa yếu tố làm đông máu được bổ sung vào từng mẫu trong số các mẫu, thời gian đông máu sau đó được đo, và so sánh thời gian đông máu của các mẫu. Trong trường

hợp người bệnh âm tính với LA, do lượng của các yếu tố đông máu giảm về mẫu được pha loãng, thời gian đông máu được kéo dài khi được so sánh với mẫu không được pha loãng. Trong trường hợp người bệnh dương tính với LA, do mẫu được pha loãng có giảm lượng các yếu tố đông máu cũng như giảm lượng LA, lượng phospholipit mà không liên kết với LA trong chất phản ứng tăng lên, và do đó, phản ứng nhờ đó thời gian đông máu được kéo dài và phản ứng nhờ đó thời gian đông máu được làm ngắn, khi được so sánh với mẫu không được pha loãng, xuất hiện đồng thời. Khi chuẩn độ LA (kháng thể) để bắt giữ phospholipit là cao, thời gian đông máu được làm ngắn khi được so sánh với mẫu không được pha loãng.

Mẫu máu mà được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế tốt hơn là máu toàn phần hoặc huyết tương, và thông thường, mẫu máu được chuẩn bị bằng cách bổ sung chất chống đông máu như là natri xitrat vào máu được gom từ đối tượng. Trong số các mẫu máu này, trong trường hợp liên quan đến các mẫu máu được lấy từ đối tượng mà đối với người đó phát hiện LA thông thường là khó khăn, sáng chế cụ thể là hữu dụng. Ví dụ về mẫu máu này bao gồm các mẫu máu của những người nhận warfarin, là những người nhận liệu pháp dùng chất chống đông máu như là liệu pháp haparin, là những người bị thiếu hụt vitamin K, và những người bệnh suy gan.

Tỷ lệ pha loãng của mẫu được pha loãng tốt hơn là 1,1 lần hoặc lớn hơn, tốt hơn là từ 1,1 đến 3 lần, và thậm chí tốt hơn là từ 1,5 đến 3 lần. Chất lỏng pha loãng được sử dụng để pha loãng mẫu máu tốt hơn là dung dịch đệm. Trong khi, khi mẫu máu được pha loãng trước, mẫu được pha loãng được sử dụng sau khi được pha loãng hơn nữa.

Trong bước (A) của phương pháp theo sáng chế, chế phẩm dung dịch đệm chứa yếu tố làm đông máu được bổ sung vào cả mẫu máu và mẫu được pha loãng. Khi thời gian đông máu được đo trong mẫu thu được bằng cách pha loãng huyết tương của người bệnh dương tính với LA, việc kéo dài thời gian đông máu có được bằng cách làm giảm hoạt tính của yếu tố đông máu và thời gian đông máu được rút ngắn có được bằng cách pha loãng LA cả hai được gây đối kháng. Khi hoạt tính của yếu tố đông máu trong huyết tương của người bệnh giảm do dùng warfarin hoặc tương tự, việc kéo dài thời gian đông máu có vẻ là ưu thế. Do đó, theo sáng chế, để ngăn chặn việc kéo

dài thời gian đông máu có được bằng cách làm giảm hoạt tính của yếu tố đông máu, và để tăng nhạy cảm với LA, chế phẩm dung dịch đệm chứa yếu tố làm đông máu được bổ sung vào cả mẫu máu và mẫu được pha loãng.

Xét đến yếu tố làm đông máu mà có mặt trong chế phẩm dung dịch đệm được sử dụng trong sáng chế, yếu tố làm đông máu mà được xem là thiếu hụt trong mẫu máu được thử nghiệm, hoặc các yếu tố đông máu mà cần thiết trong việc đo phản ứng của chất phản ứng để đo thời gian đông máu được sử dụng là ưu tiên được chọn và được sử dụng. Cụ thể, yếu tố làm đông máu bao gồm ít nhất là một yếu tố trong số các yếu tố làm đông máu được chọn từ FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI và FXII. Hơn nữa, yếu tố làm đông máu tốt hơn là bao gồm một dạng hoặc hai hoặc nhiều dạng được chọn từ FII, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI và FXII, và tốt hơn nữa là bao gồm ít nhất là một dạng hoặc hai hoặc nhiều dạng được chọn từ FII, FVII, FIX và FX. Hơn nữa, trong trường hợp đo PT, yếu tố làm đông máu tốt hơn là bao gồm một dạng hoặc hai hoặc nhiều dạng được chọn từ FII, FVII và FX. Trong trường hợp đo APTT, yếu tố làm đông máu tốt hơn là bao gồm một dạng hoặc hai hoặc nhiều dạng được chọn từ FII, FVIII, FIX, FX, FXI và FXII, và cụ thể là tốt hơn là bao gồm một dạng hoặc hai hoặc nhiều dạng được chọn từ FII và FIX. Ngoài ra, trong trường hợp đo dRVVT, yếu tố làm đông máu tốt hơn là bao gồm một dạng hoặc hai hoặc nhiều dạng được chọn từ FII và FX.

Nồng độ của các yếu tố đông máu, sau khi chế phẩm dung dịch đệm được bổ sung vào mẫu máu được thử nghiệm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01U/mL đến 2,0U/mL, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01U/mL đến 1,0U/mL. Ví dụ, trong trường hợp trộn mẫu máu được thử nghiệm và chế phẩm dung dịch đệm ở tỷ lệ là 9:1, nồng độ của các yếu tố đông máu trong chế phẩm dung dịch đệm tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01U/mL đến 20U/mL, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1U/mL đến 10U/mL.

Độ pH của dung dịch đệm có thể là giá trị pH bất kỳ mà không làm bất hoạt yếu tố làm đông máu có mặt trong chất phản ứng phụ trợ, và độ pH tốt hơn là có giá trị nằm trong khoảng từ 6 đến 9, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,0. Xét đến dung dịch đệm, dung dịch đệm được biết đến bất kỳ, như là dung dịch đệm tốt như

là HEPES, có thể được ưu tiên sử dụng. Nồng độ của dung dịch đệm có thể là nồng độ bất kỳ ở đó duy trì được khả năng đệm trong quá trình bảo quản, và nồng độ tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5mM đến 100mM, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5mM đến 50mM.

Hơn nữa, trong chất phản ứng phụ trợ, bất kỳ hợp chất được biết đến làm chất ổn định của yếu tố làm đông máu có thể là được bổ sung thích đáng. Ví dụ, glyxylglyxin, glyxylglyxylglyxin và tương tự mà được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp Patent Nhật bản số (JP-B) 06-050999 có thể được bổ sung.

Trong phương pháp theo sáng chế, chế phẩm dung dịch đệm chứa yếu tố làm đông máu được mô tả trên đây được bổ sung vào mẫu máu và mẫu được pha loãng trước khi đo hoặc ở thời điểm đo thời gian đông máu. Ở đây, việc bổ sung chế phẩm dung dịch đệm trước khi đo thời gian đông máu tương ứng với việc xử lý sơ bộ mẫu máu và mẫu được pha loãng. Trong trường hợp này, chế phẩm dung dịch đệm được bổ sung vào mẫu máu và mẫu được pha loãng để tiền xử lý mẫu máu và mẫu được pha loãng, và khi đó đo thời gian đông máu sử dụng chất phản ứng để đo đông máu. Mặt khác, việc bổ sung chế phẩm dung dịch đệm ở thời điểm đo thời gian đông máu tương ứng với quá trình bổ sung chế phẩm dung dịch đệm vào phần chất phản ứng để đo đông máu và đo thời gian đông máu. Giữa các thời điểm bổ sung này, tốt hơn là bổ sung chế phẩm dung dịch đệm vào mẫu máu và mẫu được pha loãng trước khi đo thời gian đông máu, từ quan điểm rằng tính ổn định bảo quản của các yếu tố đông máu được kết hợp trong chế phẩm dung dịch đệm là dễ dàng đảm bảo được.

Xét đến chất phản ứng để đo thời gian đông máu, chất phản ứng phụ thuộc phospholipit bất kỳ để đo thời gian đông máu hoặc phương pháp đo thể hiện là nhạy với LA có thể được sử dụng, và chất phản ứng được biết đến bất kỳ để đo thời gian protrombin (PT), thời gian thromboplastin được hoạt hóa một phần (APTT), thời gian PT được pha loãng (dPT), thời gian APTT được pha loãng (dAPTT), thời gian tạo cục khối kaolin (KCT), thời gian pha loãng nọc độc rắn hổ lục của Russell (dRVVT) và tương tự có thể được sử dụng. Các chất phản ứng được biết đến này được điều chế bằng cách kết hợp thích hợp phospholipit như là xephalin, tác nhân hoạt hóa yếu tố tiếp xúc chứa phần mang điện âm như là kaolin làm thành phần chính, các hợp chất

dẫn Ca^{2+} như là canxi clorua, nọc độc rắn hổ lục, và tương tự; theo nguyên lý đo. Xét đến dạng chất phản ứng, trạng thái làm khô mà hòa tan được ở thời điểm sử dụng, trạng thái dung dịch, hoặc tương tự có thể là ưu tiên được chọn. Đối với các chất phản ứng được mô tả trên đây, các sản phẩm có trên thị trường có thể được sử dụng trong tất cả các trường hợp. Ví dụ về các chất phản ứng để đo PT mà có trên thị trường bao gồm COAGPIA (nhãn hiệu đã được đăng ký) PT-N (là sản phẩm của SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), THROMBOCHECK PT PLUS (là sản phẩm của Sysmex Corp.), và chất phản ứng STA Series PT (là sản phẩm của Roche Diagnostics GmbH). Ví dụ về các chất phản ứng để đo APTT mà có trên thị trường bao gồm COAGPIA (nhãn hiệu đã được đăng ký) APTT-N (là sản phẩm của SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), THROMBOCHECK APTT-SLA (là sản phẩm của Sysmex Corp.), APTT Liquid "RD" và chất phản ứng PTT-LA "RD" (là sản phẩm của Roche Diagnostics GmbH). Ví dụ về các chất phản ứng để đo dRVVT mà có trên thị trường bao gồm LA Test "GRADIPORE" (là sản phẩm của Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.). Hơn nữa, một hoặc nhiều chất phản ứng này và chế phẩm dung dịch đệm chứa yếu tố làm đông máu theo sáng chế (chất phản ứng phụ trợ) có thể được kết hợp và được sử dụng làm kit phản ứng để phát hiện LA.

Tỷ lệ có thể được tính làm phương pháp so sánh thời gian đông máu của mẫu máu và mẫu được pha loãng. Ví dụ, trong trường hợp lấy thời gian đông máu của mẫu máu làm tham khảo, tỷ lệ được tính bằng công thức sau:

Tỷ lệ = (Thời gian đông máu của mẫu được pha loãng)/(thời gian đông máu của mẫu máu)

Trong trường hợp này, khi tỷ lệ là lớn hơn, do thời gian đông máu của mẫu được pha loãng được kéo dài, nó được xem là âm tính LA. Khi tỷ lệ là nhỏ hơn, nó được xem là dương tính với LA.

Giá trị ngưỡng để xác định âm tính hoặc dương tính mong muốn được tính toán theo cách thống kê bằng phương pháp chung từ các giá trị đo được của huyết tương ở người khỏe mạnh với không có bất thường về đông máu. Ví dụ, giá trị trung bình và sai lệch tiêu chuẩn (SD) được xác định từ các giá trị đo được của huyết tương của 20 hoặc nhiều người khỏe mạnh, và giá trị của (giá trị trung bình + 2SD (dựa trên các

trường hợp, giá trị trung bình - 2SD)) được tính. Theo cách khác, giá trị ngưỡng được xác định bằng phương pháp phân vị (percentile method).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng các ví dụ dưới đây, nhưng không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế ở các ví dụ này.

Các chỉ tiêu đo

(1) Thử nghiệm sàng lọc APTT

Tiến hành việc đo bằng cách sử dụng chất phản ứng PTT LA, "RD" (là sản phẩm của Diagnostica Stago, Inc.), và chất phân tích đông máu tự động, STA-R (là sản phẩm của Roche Diagnostics GmbH). Xét đến giá trị ngưỡng để xác định, giá trị của (giá trị đo được từ 20 hoặc nhiều người khỏe mạnh + 2SD) được sử dụng.

(2) Thử nghiệm dRVVT

Tiến hành việc đo bằng cách sử dụng LA Test "GRADIPORE" (là sản phẩm của Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) và chất phân tích đông máu tự động, STA-R. Xét đến giá trị ngưỡng để xác định, giá trị của (giá trị đo được từ 20 hoặc nhiều người khỏe mạnh + 2SD) được sử dụng.

(3) Thử nghiệm hỗn hợp

Tiến hành việc đo bằng cách sử dụng chất phản ứng PTT LA, "RD" (là sản phẩm của Diagnostica Stago, Inc.) và chất phân tích đông máu tự động, CP2000 (là sản phẩm của SEKISUI MEDICAL CO., LTD.). Pooled Normal Plasma (dưới đây là PNP; Precision Biologic, Inc.) được sử dụng làm huyết tương thông thường. Tỷ lệ mẫu trộn được cài đặt đến 0%, 10%, 20%, 50% và 100%, và tiến hành việc đo bằng cách pha loãng tự động mẫu sử dụng chức năng thử nghiệm hỗn hợp của CP2000. Việc xác định được thực hiện nhờ đồ thị vẽ được, và nếu đồ thị là lỗi, mẫu được xác định là dương tính với LA.

(4) Dạng biến đổi của thử nghiệm APTT (phương pháp theo sáng chế)

Tiến hành việc đo bằng cách sử dụng COAGPIA APTT-N (là sản phẩm của SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) và dung dịch đệm chứa yếu tố làm đông máu, là yếu

tổ sẽ được mô tả dưới đây (sau đây gọi là chất phản ứng phụ trợ), và sử dụng chất phân tích đông máu tự động, CP2000 (là sản phẩm của SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), với các thông số đo được chỉ ra trong Bảng 1. Cụ thể, đầu tiên, bổ sung 5 μ L chất phản ứng phụ trợ vào 45 μ L huyết tương thử nghiệm, và đo APTT bằng cách sử dụng hỗn hợp này làm mẫu (điều kiện 1). Tiếp theo, bổ sung 5 μ L chất phản ứng phụ trợ vào dạng pha loãng của huyết tương thử nghiệm với HBS (50mM HEPES ở độ pH = 7,5, và 150mM natri clorua) (huyết tương 25 μ L : HBS 20 119 μ L), và đo APTT có sử dụng hỗn hợp này làm mẫu (điều kiện 2). Khi APTT của điều kiện 1 được xác định là A giây, và APTT của điều kiện 2 được xác định là B giây, (tỷ lệ) B/A được tính làm giá trị đo được để xác định. Trong Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 1 và Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 2 mà sẽ được mô tả dưới đây, do sự có mặt hoặc không có mặt của LA được phân biệt trên cơ sở của thời gian đông máu được rút ngắn ở thời điểm pha loãng, tỷ lệ nhỏ hơn thể hiện dương tính. Xét đến giá trị ngưỡng để xác định, giá trị của (giá trị đo được của huyết tương từ 20 người khỏe mạnh hoặc nhiều hơn - 2SD) được sử dụng.

[Bảng 1]

Các thông số đo

	Huyết tương thử nghiệm	HBS	Chất phản ứng phụ trợ		APTT chất phản ứng		Dung dịch canxi clorua
Điều kiện đo 1	45 μ L	-	5 μ L	→Được ủ→	50 μ L	→Được ủ→	50 μ L
Điều kiện đo 2	25 μ L	20 μ L	5 μ L	→Được ủ→	50 μ L	→Được ủ→	50 μ L

Chất phản ứng phụ trợ

Chuẩn bị chất phản ứng phụ trợ 1 và chất phản ứng phụ trợ 2 bằng cách bổ sung yếu tố làm đông máu được chỉ ra trong Bảng 2 vào HBS (50mM HEPES độ pH = 7,5, và 150mM natri clorua) làm cơ sở. Đối với yếu tố làm đông máu, các sản phẩm của Haematologic Technologies, Inc. được sử dụng trong tất cả các trường hợp.

Hơn nữa, trong các bảng từ Bảng 3 đến Bảng 6 được mô tả dưới đây, các kết quả thu được trong trường hợp sử dụng chất phản ứng phụ trợ 1 được thể hiện là "Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 1", và các kết quả thu được trong trường hợp sử dụng chất phản ứng phụ trợ 2 được thể hiện là "Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 2".

[Bảng 2]

Chế phẩm chất phản ứng phụ trợ

	Yếu tố II ở người	Yếu tố IX ở người	Yếu tố VIII ở người
Chất phản ứng phụ trợ 1	200 μ g/mL	2U/mL	-
Chất phản ứng phụ trợ 2	200 μ g/mL	2U/mL	2U/mL

Trong Bảng 2 được mô tả trên đây, 200 μ g/mL Yếu tố II ở người tương ứng với 2U/mL.

Huyết tương thử nghiệm

Các huyết tương thử nghiệm A, B và C là các huyết tương được gom từ những người bệnh, là những người dùng warfarin. Với quan điểm từ các triệu chứng lâm sàng và tương tự, sự có mặt của LA bị phủ nhận.

Các huyết tương thử nghiệm 1 và 2 là các huyết tương trong đó yếu tố làm đông máu VIII và yếu tố làm đông máu IX là thiếu hụt. Những người bệnh không dùng chất chống đông máu.

Các huyết tương thử nghiệm từ 3 đến 10 là các huyết tương được gom từ những người bệnh, là những người nhận việc dùng heparin, mà là chất chống đông máu. Với quan điểm từ các triệu chứng lâm sàng và tương tự, sự có mặt của LA bị phủ nhận.

Các huyết tương thử nghiệm từ 11 đến 37 là các huyết tương được gom từ những người bệnh, là những người bị nghi ngờ có mang các kháng thể kháng phospholipit, theo các bệnh quan trọng hoặc các triệu chứng lâm sàng. Trong số các huyết tương này, các huyết tương từ 11 đến 24 là các huyết tương được gom từ những người bệnh, là những người dùng warfarin.

Các kết quả

Như được liệt kê trong Bảng 3, trong nhóm dùng warfarin/không LA, các giá trị thu được tất cả là cao hơn so với hoặc tương xứng với giá trị ngưỡng trong thử nghiệm sàng lọc APTT, do vậy mà suy xét từ dương tính LA là khó. Hơn nữa, trong thử nghiệm dRVVT, hai ví dụ trong số 3 ví dụ cho thấy rơi vào dương tính (trong bảng, được chỉ ra là "dương tính*"). Mặt khác, các kết quả tất cả là âm tính trong thử nghiệm trộn và Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 1 và Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 2.

[Bảng 3] Xác định mẫu dùng warfarin trong đó sự có mặt của LA bị phủ nhận

Chỉ tiêu	Sàng APTT		dRVVT			Thứ nghiệm hỗn hợp	Sàng chế 1				Sàng chế 2			
	Giây	Xác định	giây	Tỷ lệ	Xác định		giây	Tỷ lệ	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định	
Đơn vị						Xác định								
Giá trị ngưỡng	48,4			1,25				1,30				1,35		
Mẫu A (dùng warfarin)	53,1	Dương tính	56,8	48,0	1,18	Âm tính	33,7	47,8	1,42	Âm tính	29,8	43,5	1,46	Âm tính
Mẫu B (dùng warfarin)	57,4	Dương tính	77,9	54,8	1,42	Âm tính	33,9	49,3	1,45	Âm tính	30,3	45,8	1,51	Âm tính
Mẫu C (dùng warfarin)	78,7	Dương tính	112,4	67,6	1,66	Dương tính*				Âm tính	34,5	53,0	1,54	Âm tính

Như được liệt kê trong Bảng 4, trong các huyết tương của những người bệnh bị thiếu yếu tố đông máu (FVIII và FIX), trong đó sự có mặt của LA bị phủ nhận, các giá trị thu được tất cả là cao hơn so với hoặc tương xứng với giá trị ngưỡng trong thử nghiệm sàng lọc APTT, do vậy mà suy xét từ dương tính LA là khó. Mặt khác, trong thử nghiệm dRVVT, thử nghiệm hỗn hợp, và Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 1 và Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 2, các giá trị thu được tất cả là âm tính. Phương pháp theo sáng chế đòi hỏi hệ thống trong đó các yếu tố đông máu được bổ sung vào huyết tương thử nghiệm; tuy nhiên, do phương pháp bao gồm quy trình so sánh các giá trị thu được trước khi và sau khi pha loãng, các kết quả thu được trong trạng thái trong đó đơn giản các yếu tố đông máu là thiếu hụt, và các kết quả trong trường hợp mà là chất ức chế dương tính không nghi ngờ. Suy xét có thể được thực hiện rõ ràng như trong trường hợp của thử nghiệm dRVVT hoặc thử nghiệm hỗn hợp.

[Bảng 4]

Xác định huyết tương thiếu yếu tố đông máu trong đó sự có mặt của LA bị phủ nhận

Chỉ tiêu	Sàng APTT		dRVVT				Thử nghiệm hỗn hợp				Sàng chế 1				Sàng chế 2			
	giây	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ
Đơn vị																		
Giá trị ngưỡng	48,4				1,25		Xác định			1,30				1,35				
Mẫu 1 (Thiếu yếu tố 8)	153,6	Dương tính	33,8	36,3	0,93	Âm tính	Âm tính	99,7	133,8	1,34	Âm tính	36,8	57,5	1,56	Âm tính			
Mẫu 2 (Thiếu yếu tố 9)	149,2	Dương tính	80,4	74,2	1,08	Âm tính	Âm tính	33,3	44,2	1,33	Âm tính	30,7	42,1	1,37	Âm tính			

Như được liệt kê trong Bảng 5, trong nhóm dùng heparin/không LA, các giá trị thu được trong 7 ví dụ trong số 8 ví dụ tất cả là cao hơn so với hoặc tương xứng với giá trị ngưỡng trong thử nghiệm sàng lọc APTT, do vậy mà suy xét từ dương tính LA là khó. Hơn nữa, trong thử nghiệm dRVVT, hai ví dụ trong số 8 ví dụ cho thấy rơi vào dương tính (trong bảng, được chỉ ra là "dương tính*"). Mặt khác, các kết quả tất cả là âm tính trong Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 1 và Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 2.

[Bảng 5] Xác định mẫu dùng heparin trong đó sự có mặt của LA bị phủ nhận

Chỉ tiêu	Sàng APTT		dRVVT				Sáng chế 1				Sáng chế 2			
	giây	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định
Giá trị ngưỡng	48,4				1,25				1,30				1,35	
Mẫu 3 (dùng heparin)	202,0	Dương tính	48,9	43,5	1,12	Âm tính	88,2	148,0	1,68	Âm tính	70,0	126,7	1,81	Âm tính
Mẫu 4 (dùng heparin)	96,1	Dương tính	54,0	43,6	1,24	Âm tính	49,3	71,7	1,45	Âm tính	42,6	65,8	1,54	Âm tính
Mẫu 5 (dùng heparin)	e.	Dương tính	39,6	37,2	1,06	Âm tính	45,5	71,0	1,56	Âm tính	39,9	66,1	1,66	Âm tính
Mẫu 6 (dùng heparin)	61,4	Dương tính	60,5	47,7	1,27	Dương tính*	43,8	63,7	1,45	Âm tính	38,1	60,5	1,59	Âm tính
Mẫu 7 (dùng heparin)	45,6	Âm tính	38,3	33,8	1,13	Âm tính	40,8	64,7	1,59	Âm tính	36,3	58,0	1,60	Âm tính
Mẫu 8 (dùng heparin)	145,2	Dương tính	64,9	46,8	1,39	Dương tính*	76,4	118,8	1,55	Âm tính	61,9	100,6	1,63	Âm tính
Mẫu 9 (dùng heparin)	57,1	Dương tính	40,8	38,5	1,06	Âm tính	47,7	73,7	1,55	Âm tính	44,6	67,6	1,52	Âm tính
Mẫu 10 (dùng heparin)	56,3	Dương tính	41,7	36,6	1,14	Âm tính	39,8	60,2	1,51	Âm tính	36,9	57,5	1,56	Âm tính

e.: lỗi xuất phát từ khoảng giá trị đo

Bảng 6 liệt kê các kết quả của nhóm mẫu mà bị nghi ngờ có LA. Trong nhóm dùng warfarin, các giá trị thu được trong 13 ví dụ từ 14 ví dụ là cao hơn so với hoặc tương xứng với giá trị ngưỡng trong thử nghiệm sàng lọc APTT; tuy nhiên, khi các kết quả của Bảng 3 được xem xét, suy xét từ dương tính LA là khó. Ngoài ra, trong thử nghiệm dRVVT, các kết quả của 13 ví dụ từ 14 ví dụ là dương tính; tuy nhiên, do có khả năng dẫn đến rơi vào dương tính do dùng warfarin được đề xuất từ các kết quả của Bảng 3, suy xét giữa rơi vào dương tính do warfarin và dương tính LA là khó. Trong khi, mẫu âm tính trong thử nghiệm sàng lọc APTT (mẫu 16) và mẫu âm tính trong thử nghiệm dRVVT (mẫu 19) là không trùng nhau. Mặt khác, trong thử nghiệm hỗn hợp, các kết quả của 3 ví dụ từ 14 ví dụ là dương tính, và tất cả 3 ví dụ dương tính là dương tính cả trong Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 1 và Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 2. Do đó, dự tính rằng có khả năng cao mà trong số các kết quả của thử nghiệm dRVVT, ít nhất là 7 ví dụ từ 14 ví dụ (trong bảng, được chỉ ra là "Dương tính*") có thể là rơi vào dương tính. Đối với 3 ví dụ mẫu mà được xác định âm tính trong thử nghiệm hỗn hợp nhưng dương tính trong Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 1 và Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 2 (các mẫu 11, 21 và 23), kháng thể kháng β 2GPI (sau đây gọi là a β 2GPI) và kháng thể hỗn hợp protrombin kháng phosphatidylserin (sau đây gọi là aPS/PT), mà có thể được xem là các kháng thể chịu trách nhiệm về LA, được đo, và các mẫu 11 và 21 là dương tính đối với cả hai kháng thể này, trong khi mẫu 23 là dương tính đối với aPS/PT. Từ các kết quả trên đây, dự tính rằng có khả năng rất cao là các kết quả của 3 ví dụ này thu được trong thử nghiệm hỗn hợp rơi vào âm tính, và là dương tính với LA trong thực tế.

Trong nhóm không dùng warfarin, các kết quả của 6 ví dụ trong số 13 ví dụ là dương tính trong tất cả các chỉ tiêu, và các kết quả của hai ví dụ là âm tính. Do đó, trong 8 ví dụ này, suy xét về dương tính/âm tính là có thể. Trong số 5 ví dụ còn lại, a β 2GPI và aPS/PT được đo đối với mẫu 30 cho thấy dương tính chỉ trong Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 1 và Kết quả thử nghiệm theo sáng chế 2. Tuy nhiên, do a β 2GPI là dương tính, dự tính rằng có khả năng rất cao là các kết quả đối với dRVVT và thử nghiệm hỗn hợp rơi vào âm tính, và là dương tính với LA trong thực tế.

[Bảng 6] Xác định mẫu dùng warfarin/không dùng warfarin trong đó sự có mặt của LA bị nghi ngờ

Chỉ tiêu	Sàng APTT		dRVVT				Thử nghiệm hỗn hợp		Sáng chế 1				Sáng chế 2				aβ2GPI	aPS/PT
	giây	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định	Xác định	giây	Tỷ lệ	Xác định	giây	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định	Dương tính	Xác định	Xác định
Giá trị ngưỡng	48,4				1,25		Xác định		1,30					1,35				
Mẫu 11 (dùng warfarin)	143,0	Dương tính	220,4	82,5	2,67	Dương tính	Âm tính	102,5	0,75	Dương tính	80,5	66,4	0,82	Dương tính	Dương tính	Dương tính		Dương tính
Mẫu 12 (dùng warfarin)	117,5	Dương tính	126,4	55,4	2,28	Dương tính	Dương tính	82,8	0,98	Dương tính	70,7	72,7	1,03	Dương tính	Dương tính			
Mẫu 13 (dùng warfarin)	71,9	Dương tính	100,4	60,3	1,67	Dương tính*	Âm tính	41,2	1,33	Âm tính	35,6	49,6	1,39	Âm tính	Âm tính			
Mẫu 14 (dùng warfarin)	57,5	Dương tính	72,1	57,1	1,26	Dương tính*	Âm tính	33,0	1,57	Âm tính	30,4	49,4	1,63	Âm tính	Âm tính			
Mẫu 15 (dùng warfarin)	49,4	Dương tính	60,7	45,9	1,32	Dương tính*	Âm tính	35,9	1,40	Âm tính	32,0	45,9	1,43	Âm tính	Âm tính			
Mẫu 16 (dùng warfarin)	48,2	Âm tính	57,6	45,3	1,27	Dương tính*	Âm tính	36,8	1,43	Âm tính	33,1	50,3	1,52	Âm tính	Âm tính			
Mẫu 17 (dùng warfarin)	87,0	Dương tính	99,2	49,4	2,01	Dương tính	Dương tính	46,9	1,17	Dương tính	42,9	51,6	1,20	Dương tính	Dương tính			
Mẫu 18 (dùng warfarin)	52,0	Dương tính	97,8	58,8	1,66	Dương tính*	Âm tính	36,3	1,45	Âm tính	34,1	50,9	1,49	Âm tính	Âm tính			
Mẫu 19 (dùng warfarin)	91,4	Dương tính	75,5	64,3	1,17	Âm tính	Âm tính	45,8	1,48	Âm tính	41,6	63,8	1,53	Âm tính	Âm tính			
Mẫu 20 (dùng warfarin)	88,9	Dương tính	60,7	47,7	1,27	Dương tính*	Âm tính	36,4	1,54	Âm tính	33,0	52,9	1,60	Âm tính	Âm tính			
Mẫu 21 (dùng warfarin)	355,3	Dương tính	221,1	71,7	3,08	Dương tính	Âm tính	145,5	0,95	Dương tính	113,4	121,5	1,07	Dương tính	Dương tính	Dương tính		Dương tính
Mẫu 22 (dùng warfarin)	74,1	Dương tính	80,1	51,8	1,55	Dương tính	Dương tính	57,0	1,17	Dương tính	49,3	58,5	1,19	Dương tính	Dương tính			
Mẫu 23 (dùng warfarin)	89,3	Dương tính	71,8	51,9	1,38	Dương tính	Âm tính	66,3	0,94	Dương tính	56,6	56,2	0,99	Dương tính	Dương tính	Âm tính		Dương tính

Chỉ tiêu	Sàng APTT		dRVVT				Thử nghiệm hỗn hợp	Sáng chế 1				Sáng chế 2				aβ2GPI	aPS/PT
	giây	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định		giây	Tỷ lệ	Xác định	giây	giây	Tỷ lệ	Xác định	Xác định	Xác định	Xác định
Mẫu 24 (dùng warfarin)	100,9	Dương tính	74,5	52,3	1,42	Dương tính*	Âm tính	46,0	1,53	Âm tính	42,3	63,1	1,49	Âm tính			
Mẫu 25 (không dùng warfarin)	53,4	Dương tính	45,8	36,6	1,25	Dương tính	Âm tính	36,1	1,30	Âm tính	32,9	45,9	1,40	Âm tính			
Mẫu 26 (không dùng warfarin)	78,6	Dương tính	92,2	40,5	2,28	Dương tính	Dương tính	52,8	1,17	Âm tính	49,3	58,8	1,19	Âm tính			
Mẫu 27 (không dùng warfarin)	39,1	Âm tính	43,3	33,4	1,30	Dương tính	-	26,9	1,43	Âm tính	25,8	37,6	1,46	Âm tính			
Mẫu 28 (không dùng warfarin)	43,8	Âm tính	42,9	37,2	1,15	Âm tính	-	40,3	1,33	Âm tính	35,9	49,5	1,38	Âm tính			
Mẫu 29 (không dùng warfarin)	42,7	Âm tính	40,8	34,8	1,17	Âm tính	-	34,9	1,41	Âm tính	32,4	46,7	1,44	Âm tính			
Mẫu 30 (không dùng warfarin)	38,3	Âm tính	42,0	34,2	1,23	Âm tính	-	22,9	1,26	Dương tính	21,8	28,4	1,30	Dương tính	Dương tính		Âm tính
Mẫu 31 (không dùng warfarin)	77,7	Dương tính	79,3	38,4	2,07	Dương tính	Dương tính	53,1	1,19	Dương tính	45,2	59,1	1,31	Dương tính	Dương tính		
Mẫu 32 (không dùng warfarin)	90,5	Dương tính	78,2	38,9	2,01	Dương tính	Dương tính	63,0	1,22	Dương tính	54,8	71,3	1,30	Dương tính	Dương tính		
Mẫu 33 (không dùng warfarin)	33,8	Âm tính	39,1	31,2	1,25	Dương tính	-	23,4	1,44	Âm tính	22,5	33,0	1,47	Âm tính			
Mẫu 34 (không dùng warfarin)	54,9	Dương tính	44,5	35,9	1,24	Âm tính	Âm tính	36,1	1,41	Âm tính	33,3	45,8	1,38	Âm tính			
Mẫu 35 (không dùng warfarin)	85,7	Dương tính	82,0	42,3	1,94	Dương tính	Dương tính	50,8	1,14	Âm tính	44,2	52,7	1,19	Âm tính			
Mẫu 36 (không dùng warfarin)	80,5	Dương tính	90,1	42,6	2,12	Dương tính	Dương tính	46,6	1,01	Âm tính	40,1	44,6	1,11	Âm tính			
Mẫu 37 (không dùng warfarin)	80,0	Dương tính	88,9	43,7	2,03	Dương tính	Dương tính	50,3	1,08	Âm tính	40,7	49,6	1,22	Âm tính			

Trong thử nghiệm sàng lọc APTT và thử nghiệm dRVVT, hệ thống này bị ảnh hưởng bởi các chất chống đông máu như heparin hoặc warfarin, và dẫn đến rơi vào dương tính. Hơn nữa, trong thử nghiệm hỗn hợp, hệ thống này bị ảnh hưởng bởi warfarin hoặc tương tự, và có thể dẫn đến rơi vào âm tính. Phương pháp theo sáng chế có thể đạt tới mức suy xét rõ ràng từ sự thiếu hụt yếu tố đông máu mà không bị ảnh hưởng bởi các chất chống đông máu như heparin hoặc warfarin như trong trường hợp của thử nghiệm sàng lọc APTT và thử nghiệm dRVVT, và thể hiện khả năng nhạy cảm cao hơn và ít rơi vào âm tính hơn so với thử nghiệm hỗn hợp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện chất chống đông máu luput, phương pháp này bao gồm các bước (A), (B) và (C) sau đây:

(A) bổ sung chế phẩm dung dịch đệm chứa yếu tố làm đông máu vào từng mẫu máu và mẫu được pha loãng của mẫu máu trước khi đo hoặc ở thời điểm đo thời gian đông máu;

(B) đo thời gian đông máu đối với các mẫu khác nhau của bước (A); và

(C) so sánh thời gian đông máu đối với các mẫu khác nhau thu được trong bước (B),

trong đó khi tỷ lệ

$(\text{Thời gian đông máu của mẫu được pha loãng})/(\text{thời gian đông máu của mẫu máu})$

nhỏ hơn giá trị ngưỡng tính được từ các giá trị đo được của huyết tương ở người khỏe mạnh với không có bất thường về đông máu, mẫu máu được xem là dương tính với chất chống đông máu luput.

2. Phương pháp phát hiện theo điểm 1, trong đó yếu tố làm đông máu là một dạng hoặc hai hoặc nhiều dạng được chọn từ FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI và FXII.

3. Phương pháp phát hiện theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mẫu máu là máu toàn phần hoặc huyết tương.

4. Phương pháp phát hiện theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm dung dịch đệm chứa yếu tố làm đông máu được bổ sung vào mẫu máu trước khi đo thời gian đông máu.

5. Phương pháp phát hiện theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phương pháp để đo thời gian đông máu là thời gian thromboplastin được hoạt hóa hoặc thời gian pha loãng nọc độc rắn hổ lục của Russell.