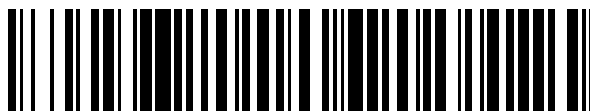


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 592**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009** **E 09766412 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014** **EP 2290370**

54 Título: **Método para determinar la causa de la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea**

30 Prioridad:

18.06.2008 JP 2008159144

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

10.02.2015

73 Titular/es:

SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (100.0%)

**13-5, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAMURA, REMI;
MORIKAWA, CHIZURU;
SUNAGA, HIROYUKI y
YAGO, HIROKAZU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 528 592 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

Método para determinar la causa de la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para determinar una causa de la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea en una muestra de sangre.

10 Antecedentes de la técnica

Un ensayo de coagulación sanguínea se realiza para explorar la presencia o ausencia de cualquier anomalía en el sistema de reacción de coagulación sanguínea, o para medir la actividad de factores individuales, midiendo el inicio del período de tiempo desde el momento en el que se añade un activador y/o Ca^{2+} y similar en un espécimen o en una mezcla de especímenes, hasta el momento en el que se formen coágulos de fibrina detectables (tiempo de coagulación sanguínea; en lo sucesivo en el presente documento, ocasionalmente también denominado simplemente como tiempo de coagulación). Los ejemplos típicos del tiempo de coagulación sanguínea incluyen el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y tiempo de trombina.

El TP es el tiempo que transcurre desde la adición de un líquido mixto de tromboplastina tisular y Ca^{2+} a un plasma de ensayo hasta la coagulación del plasma sanguíneo, y el objeto del TP es realizar un examen exhaustivo de las actividades de coagulación del factor VII, factor X, factor V, protrombina, fibrinógeno y similares, que están relacionadas con la ruta de coagulación extrínseca. El TTPA es el tiempo que transcurre desde la adición de una cantidad suficiente de fosfolípidos y un agente activador (caolín, anhídrido silícico, ácido eláico o similar) y una cantidad apropiada de Ca^{2+} a un plasma de ensayo hasta la coagulación del plasma sanguíneo, y el objeto del TTPA es realizar un examen exhaustivo de las actividades de coagulación de factor XII, factor XI, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular, factor IX, factor VIII, factor X, factor V, protrombina, fibrinógeno y similar, que están relacionados con la ruta de coagulación intrínseca. En general, lo que se conoce como anomalías en estos ensayos de coagulación sanguínea es la prolongación del tiempo de coagulación. Las anomalías en los sistemas de reacción de coagulación sanguínea reflejan los síntomas de la tendencia a hemorragia o de la tendencia a trombosis (tendencia a la coagulación sanguínea) en el organismo.

Las causas de estas anomalías que pueden considerarse incluyen: 1) un déficit o una disminución en los factores de coagulación sanguínea, 2) la presencia de un anticuerpo contra un componente sanguíneo que constituye el sistema de coagulación sanguínea, 3) la presencia de un anticuerpo contra un componente en el reactivo para medir el tiempo de coagulación sanguínea, 4) la presencia de un anticuerpo contra un compuesto entre un componente sanguíneo que constituye el sistema de coagulación sanguínea y un componente en el reactivo para medir el tiempo de coagulación sanguínea y 5) la administración de un fármaco que inhibe la reacción de la coagulación sanguínea.

Sin embargo, realizando simplemente la medición del tiempo de coagulación sanguínea no permite diferenciar si la causa es una disminución en la actividad debido a un simple déficit de factores de coagulación, o una disminución en la actividad debido a la inhibición de la reacción de coagulación por un anticuerpo (inhibidor) contra un componente o similar en un componente que constituye el sistema de coagulación sanguínea o un componente en el reactivo para medir el tiempo de coagulación sanguínea. Adicionalmente, dado que la actuación terapéutica varía con la diferencia en las causas, la diferenciación de las causas es importante. Por tanto, se ha realizado un ensayo de corrección de coagulación sanguínea (ensayo mixto) en el que a un plasma de ensayo se le añade plasma normal, y se representa el grado del tiempo de coagulación sanguínea del plasma de ensayo que se está corrigiendo (normalizado) para determinar la causa (Documento no Patente 1).

El ensayo mixto se ha realizado tradicionalmente, por ejemplo, de la manera descrita a continuación.

Se prepara una muestra añadiendo plasma normal a plasma de ensayo y se mezclan de tal manera que la proporción del plasma normal sea de 0, 20, 50, 80 o 100 %, y se mide el TTPA. Los resultados se representan en un gráfico (eje horizontal: proporción del plasma normal mezclado o la proporción del plasma de ensayo (%), eje vertical: tiempo de coagulación (segundos)), y la causa se determina visualmente a partir de la forma del gráfico. Por ejemplo, en el caso de un déficit de un factor de coagulación, la adición de una pequeña cantidad de plasma normal (20 % en la FIG. 1 (A)) disminuye significativamente el tiempo de coagulación aproximando de esta manera el tiempo de coagulación al valor que puede obtenerse en el caso de plasma normal. Por lo tanto, el gráfico muestra una curva convexa por debajo de una línea recta (línea de puntos) que conecta los puntos correspondientes al plasma de ensayo y al plasma normal (FIG. 1 (A)).

Cuando está presente un inhibidor de un factor de coagulación, el inhibidor inactiva el factor de coagulación en el plasma normal, incluso aunque se aumente la proporción del plasma normal añadido. Por lo tanto, el grado de una mejora en el tiempo de coagulación debido a la adición de plasma normal es bajo, y se muestra una curva convexa por debajo de la línea recta (FIG. 1 (B)).

Sin embargo, dependiendo del espécimen, puede obtenerse un gráfico con una forma similar a la línea de puntos (FIG. 1(C)) y en ese caso, existe un problema de que es muy difícil realizar una determinación.

Adicionalmente, dado que el ensayo mixto implica realizar una determinación por inspección visual, no hay ningún método unificado para cuantificar el grado de corrección, y la determinación final se encomienda al evaluador. Por lo tanto, existe otro problema de que es posible que el resultado de la determinación haya cambiado dependiendo del grado de destreza del evaluador.

Además, también existe la posibilidad de que el resultado de la determinación pueda variar dependiendo de la diferencia en la sensibilidad del reactivo para medir el inhibidor del factor de coagulación. Particularmente, el anticoagulante lúpico (en lo sucesivo en el presente documento AL) se conoce como un inhibidor de factores de coagulación que depende de la sensibilidad del reactivo. El AL no es un inhibidor contra factores de coagulación individuales, sino una inmunoglobulina que inhibe la reacción de coagulación dependiente de fosfolípidos. Dado que la presencia de fosfolípidos es esencial para la reacción de coagulación, normalmente, muchos de los reactivos para medir la coagulación sanguínea son ricos en fosfolípidos. El AL reacciona con los fosfolípidos en el reactivo, consumiendo de esta manera estos fosfolípidos, y consecuentemente inhibe la reacción de coagulación. Por lo tanto, ensayos de coagulación, tales como el TP y el TTPA a menudo se encuentra que son anómalos. Sin embargo, dado que el AL produce intensidades de reacción que varían con el tipo de fosfolípidos (origen, composición del fosfolípido y similar), se sabe que se obtienen diferentes resultados de determinación en base al reactivo usado.

También hay métodos conocidos, como los que se indican más adelante, para la determinación, que no dependen del grado de destreza del evaluador y que facilitan la determinación (Documento 2 no Patente). Cuando el tiempo de coagulación para un plasma de ensayo se denomina a, el tiempo de coagulación para una mezcla de un plasma de ensayo y un plasma normal a una proporción de mezcla de 5:5 se denomina b, y el tiempo de coagulación para un plasma normal se denomina c,

$$1) (a+c) / 2 \leq b, \quad 2) (b-c) / a \geq x, \quad 3) b-c \geq x, \quad 4) b/c \geq x$$

El método de determinación (1) expresa simplemente en valores numéricos si el gráfico es convexo por encima de la línea recta, o si el gráfico es convexo por debajo de la línea recta y por tanto la determinación por inspección visual y el resultado no cambian. El método de determinación (2) también se conoce como Índice de Rosner, y se considera como un método de determinación útil para determinar el AL en particular. En este método, se considera que un valor de 0,15 es apropiado para x, pero este valor es un valor establecido para el tiempo de coagulación con caolín (TCC). Realmente, cada reactivo usado en diversos centros requiere un ajuste apropiado para x, pero los métodos para dicho ajuste no se conocen claramente (Documento no Patente 3). Los métodos de determinación (3) y (4) también requieren ajustar x para diversos centros, pero los métodos de dichos ajustes no se conocen claramente y no puede decirse que sean satisfactorios como métodos de determinación.

Documentos de técnicas relacionadas

Documentos no Patente

Documento no Patente 1: Kensa To Gijutsu (Examination and Technology), vol 34. no 8, agosto de 2006, páginas 735-742

Documento no Patente 2: Rinsho Kensaho Teiyo (Compendium of Clinical Examination Methods), 32ª Edición, página 443

Documento no Patente 3: Thrombo. Haemost. Vol. 57, Nº 2, 1987, páginas 144-147

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

Como se ha indicado anteriormente, los métodos convencionales carecen de claridad en la técnica de establecer el valor de límite y tienen el riesgo de que los inhibidores de factores de coagulación fracasan en especímenes débilmente positivos. Realmente, en la revisión realizada por los inventores de la presente invención, se ha reconocido un ejemplo en el que el gráfico obtenido mediante un ensayo mixto en el caso de un espécimen débilmente positivo al AL muestra una curva convexa por debajo de la línea recta. Además, el ensayo mixto depende en gran medida de la diferencia en la sensibilidad al inhibidor de factores de coagulación de los reactivos de medición, y existe una posibilidad de que el resultado de la medición pueda variar con el reactivo. Además, el método de determinación por inspección visual depende enormemente de la experiencia del evaluador, como se ha descrito anteriormente, y tiene un riesgo de que el resultado de la determinación pueda variar con la diferencia en el nivel de destreza.

Por lo tanto, hay una fuerte demanda para desarrollar un método de determinación que no dependa de la intensidad de la sensibilidad contra un inhibidor de factores de coagulación en un reactivo o de la diferencia en el nivel de destreza del evaluador, y que tenga por objeto obtener resultados de determinación coherentes en cuanto a si la

prolongación del tiempo de coagulación sanguínea está causada por la presencia de un inhibidor de factores de coagulación o por un déficit de un factor de coagulación.

Medios para resolver los problemas

Los inventores de la presente invención realizaron una exhaustiva investigación, y como resultado, descubrieron que los problemas descritos anteriormente podían resolverse mediante un método de determinación, como se muestra a continuación, en el que los resultados de un ensayo mixto no están determinados por inspección visual sino por una comparación de la proporción del área en el gráfico y también se define claramente la determinación del valor de límite. Por tanto, los inventores dan por concluida la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona las siguientes invenciones:

1. Un método para determinar una causa de la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea en plasma de ensayo, incluyendo el método:

(1) medir tiempos de coagulación sanguínea de muestras incluyendo (a) solo el plasma de ensayo, (b) solo plasma normal y (c) el plasma de ensayo y el plasma normal mezclados al menos a una proporción de mezcla;

(2) dibujar un gráfico de línea poligonal representando los resultados de medición de las muestras (a), (b) y (c), representando un eje vertical el tiempo de coagulación sanguínea o una proporción de prolongación del tiempo de coagulación sanguínea y representando un eje horizontal la relación de mezcla o proporción de mezcla del plasma de ensayo o del plasma normal, y determinar de este modo un área A bajo la línea poligonal y un área B bajo un segmento lineal que conecta los resultados de medición de las muestras (a) y (b) representados;

(3) calcular una proporción del área (A-B) obtenida restando el área B del área A, con respecto al área B, $((A-B)/B)$: proporción de área X);

(4) realizar las etapas de (1) y (2) para un plasma positivo a un inhibidor de factores de coagulación y determinar de antemano una proporción de área patrón Y; y

(5) comparar la proporción del área X y la proporción del área Y patrón y determinar el plasma de ensayo como un tipo inhibidor de factores de coagulación en el caso en el que $Y \leq X$, o como un tipo que carece de factores de coagulación en el caso en el que $Y > X$.

2. El método de 1, en el que la proporción del área Y patrón para el plasma positivo a un inhibidor de factores de coagulación es un valor determinado con respecto a un plasma positivo a un inhibidor de factores de coagulación mostrando un tiempo de coagulación que es mayor que el límite superior de un intervalo patrón que se ha obtenido por procesamiento estadístico del tiempo de coagulación sanguínea de una pluralidad de plasmas de personas sanas, y no mayor que un valor del límite superior +50 %.

3. El método de 2, en el que el intervalo patrón para el tiempo de coagulación sanguínea de plasmas de personas sanas se obtuvo procesando estadísticamente el tiempo de coagulación sanguínea de una pluralidad de plasmas de personas sanas.

4. El método de 1, en el que cuando el eje vertical se usa para representar el tiempo de coagulación sanguínea en (2) de 1, los valores obtenidos restando un número constante del mismo se usan para el área A y para el área B.

5. El método de 4, en el que el número constante se obtiene dibujando una línea auxiliar paralela al eje horizontal en la representación del tiempo de coagulación sanguínea del plasma normal dibujada en forma de una gráfica de línea poligonal, y calcular el área bajo la línea auxiliar.

6. El método de uno cualquiera de 1 a 5, en el que el tiempo de coagulación sanguínea es al menos uno seleccionado de TP (Tiempo de Protrombina), TTPA (tiempo de tromboplastina parcial activada), TPd (TP diluida), TTPAd (TTPA diluida), TCC (tiempo de coagulación con caolín), y TVVRd (tiempo del veneno de la víbora de Russell diluido).

7. El método de uno cualquiera de 1 a 6, en el que el inhibidor de factores de coagulación es al menos uno seleccionado de Anticoagulante Lúpico (AL), un inhibidor del factor VIII, un inhibidor del factor IX, y un inhibidor del factor V.

Efectos de la invención

De acuerdo con el método de la presente invención, la determinación del plasma en el que el inhibidor de factores de coagulación es débilmente positivo, cuya determinación ha sido tradicionalmente difícil, puede realizarse de un modo preciso. Además, de acuerdo con el método de la presente invención, la determinación precisa puede realizarse fácilmente, sin influir en el grado de destreza del evaluador. Por lo tanto, de acuerdo con el método de la presente invención, puede determinarse una actuación terapéutica adecuada para un paciente con tiempo de coagulación prolongado que puede determinarse mediante un ensayo de tiempo de coagulación sanguínea.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama que muestra los resultados de un ensayo mixto de acuerdo con un método convencional. La FIG. 1(A) representa un tipo que carece de factores de coagulación, la FIG. 1(B) representa un tipo inhibidor de factores de coagulación, y la FIG. 1(C) representa un patrón de una causa definida;

La FIG. 2 es un diagrama que muestra un ejemplo del área bajo el gráfico de la línea poligonal de la etapa (2);

La FIG. 3 es un diagrama que muestra un ejemplo del área bajo el gráfico de la línea poligonal de la etapa (2);

La FIG. 4 es un diagrama que muestra un ejemplo del área (A-B) de la etapa (3) (que corresponde a la FIG. 2.);

La FIG. 5 es un diagrama que muestra un ejemplo del área (A-B) de la etapa (3) (que corresponde a la FIG. 3.);

La FIG. 6 es un gráfico de línea poligonal representado para el espécimen N° 1;

La FIG. 7 es un gráfico de línea poligonal representada para el espécimen N° 4; y

La FIG. 8 es un gráfico de línea poligonal representada para el espécimen N° 6.

Mejor modo para realizar la invención

Como plasma de ensayo a usar en la presente invención, se prefiere usar plasma sanguíneo, en lugar de usar directamente sangre, y es más preferible usar plasma pobre en plaquetas. Esto es porque los fosfolípidos derivados de plaquetas que permanecen en el plasma sanguíneo pueden eliminar la posibilidad de que un inhibidor de factores de coagulación dependiente de fosfolípidos, tal como el AL, se vuelva negativo.

El plasma sanguíneo normal que se usa en la mezcla con el plasma sanguíneo puede ser plasma normal auto-preparado o disponible en el comercio, y preferentemente, se prefiere plasma normal que se ha sometido a eliminación de plaquetas. Pueden usarse técnicas conocidas para el método de eliminación de plaquetas como se describe anteriormente, y, por ejemplo, puede usarse la centrifugación o el tratamiento con filtro eliminador de plaquetas. Ejemplos conocidos de productos disponibles en el comercio incluyen Pooled Normal Plasma (fabricado por Precision Biologic, Inc.), Platelet Poor Plasma (Technoclon GmbH), y LATrol (marca registrada) Normal Control (American Diagnostica, Inc.).

Ejemplos conocidos de inhibidores de factores de coagulación incluyen, sin limitación, un inhibidor del factor VIII, un inhibidor del factor IX y un inhibidor del factor V, además del AL. El método de la presente invención puede aplicarse cuando se usa un reactivo para medir el tiempo de coagulación sanguínea que muestra sensibilidad hacia el inhibidor de factores de coagulación sujeto.

Por ejemplo, cuando como sujeto se usa AL, puede usarse cualquier reactivo para medir el tiempo de coagulación sanguínea dependiente de fosfolípidos, cuyo reactivo muestre sensibilidad hacia el AL, y reactivos que miden el TP, TTPA, TTPAd, TPd, TCC y TVVRd están en uso. Además, cuando como sujeto se usa el inhibidor del factor VIII o el inhibidor del factor IX, se usa un reactivo que mide el TTPA o similar, y cuando como sujeto se usa el inhibidor del factor V, se usa un reactivo que mide el TTPA, un reactivo que mide el TP o similar. Pueden usarse productos disponibles en el comercio para todos estos reactivos. Por ejemplo, los ejemplos de reactivos que miden el TP disponibles en el comercio incluyen Coagpia (marca registrada) PT-S (fabricado por Sekisui Medical Co., Ltd.), ThromboCheck PT Plus (fabricado por Sysmex Corp.), y STA Reagent Series PT (fabricado por F. Hoffmann-La Roche, Ltd.). Ejemplos de reactivos que miden el TTPA disponibles en el comercio incluyen Coagpia (marca registrada) APTT-S (fabricado por Sekisui Medical Co., Ltd.), ThromboCheck APTT-SLA (fabricado por Sysmex Corp.), y APTT Liquid RD (fabricado por F. Hoffmann -La Roche, Ltd.).

Por otro lado, ejemplos de un factor de coagulación, que se sospecha que es deficitario o reducido debido a una anomalía en el ensayo de coagulación sanguínea, incluyen fibrinógeno, protrombina, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular y factor de von Willebrand (vWF).

En la etapa (1) del método de determinación de la invención, se mide el tiempo de coagulación sanguínea de muestras que incluyen (a) solo plasma sanguíneo, (b) solo plasma normal y (c) un plasma mixto obtenido como se ha descrito anteriormente.

En la medición del tiempo de coagulación sanguínea (ensayo mixto) usando una muestra preparada mezclando un plasma de ensayo y un plasma normal al menos a una proporción de mezcla, el número de representación gráfica puede ser 3 puntos o mayor incluyendo los propios plasmas de ensayo y plasmas normales, pero para aclarar el modelo de variación del tiempo de coagulación que acompaña a la variación de la proporción de mezcla entre el plasma de ensayo y el plasma normal, es preferible un número de representación gráfica de 4 puntos o mayor, y es más preferible de 5 puntos o mayor. El límite superior del número de representación gráfica no está particularmente limitado, pero cuando se considera la eficacia económica o el tiempo de medición, el número de representación gráfica es preferentemente de 10 puntos o menor, y más preferentemente de 7 puntos o menor.

La proporción de la prolongación del tiempo de coagulación es una proporción relativa definida cuando la diferencia entre el tiempo de coagulación del plasma normal y el tiempo de coagulación del plasma de ensayo solamente es de 1. De hecho, la proporción de la prolongación también puede representarse por el porcentaje relativo definido

tomando la diferencia en el tiempo de coagulación como 100.

La etapa (2) es una etapa realizada dibujando un gráfico de línea poligonal usando los resultados de medición de (a), el tiempo de coagulación de la muestra que contiene solo plasma de ensayo, (b) el tiempo de coagulación de la muestra que contiene solo un plasma normal y (c) el tiempo de coagulación de la muestra que contiene un líquido mixto de las mismas, y representando gráficamente los resultados de medición de los puntos (a), (b) y (c), representando el eje vertical el tiempo de coagulación sanguínea o la proporción de la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea y representando el eje horizontal la relación de mezcla o la proporción de mezcla del plasma de ensayo o del plasma normal, para así determinar el área A bajo la línea poligonal y el área B bajo un segmento lineal que conecta los resultados de medición representados gráficamente de los puntos (a) y (b). Por ejemplo, las FIGs. 2 y 3 presentan los ejemplos del gráfico de línea poligonal en el caso de tomar el eje vertical que representa la proporción de prolongación del tiempo de coagulación (número de representación gráfica 3, es decir, un ejemplo en el que el líquido mixto es de un solo tipo). En este caso, el área (A) es el área, por ejemplo, de un cuadrado mostrado en la FIG. 2 o 3. La Figura 4 es un diagrama con una línea diagonal añadida a la FIG. 3. El área (B) es el área del triángulo de ángulos rectos que tiene la línea diagonal como la hipotenusa, como se muestra en la FIG. 4 o 5. Además, en el caso de tomar el eje vertical para representar el tiempo de coagulación sanguínea, los valores del área A y B pueden usarse directamente, o también pueden usarse valores que pueden obtenerse después de restar un número constante de las dos áreas. Como número constante, por ejemplo, cuando se dibuja una línea auxiliar paralela al eje horizontal en una representación gráfica del tiempo de coagulación sanguínea del plasma normal, puede usarse el valor del área bajo la línea auxiliar.

La etapa (3) es una etapa para calcular la proporción del área (A-B), que es el valor que puede obtenerse restando el área (B) de un triángulo de ángulos rectos que tiene la línea diagonal en conexión con el tiempo de coagulación sanguínea o la proporción de la prolongación del tiempo de coagulación de la muestra que contiene solo el plasma de ensayo y la muestra que contiene solo el plasma normal, a partir del área (A) de un polígono formado por el gráfico de línea poligonal, el eje horizontal y el eje vertical, con respecto al área del triángulo de ángulos rectos, $((A-B) / (B))$: proporción de área X. La proporción de área también puede expresarse en porcentaje.

En el caso de la FIG. 4, dado que el área de (A) es mayor que el área de (B), la proporción $(A-B) / (B)$ es un número positivo. Por otro lado, en el caso de la FIG. 5, dado que el área (A) es menor que el área (B), la proporción $(A-B) / (B)$ es un número negativo.

La etapa (4) es una etapa para determinación del valor de límite.

Por tanto es deseable, como muestra para determinar el valor de límite, un plasma positivo a un inhibidor de factores de coagulación que presente un tiempo de coagulación que sea próximo al tiempo de coagulación del plasma de una persona sana, para aumentar la sensibilidad de la detección del inhibidor de factores de coagulación. Por ejemplo, el tiempo de coagulación sanguínea de una muestra para determinar el valor de límite es mayor que el límite superior de un intervalo patrón para personas sanas, que se ha obtenido procesando estadísticamente el tiempo de coagulación sanguínea de una pluralidad de plasmas de personas sanas, y el tiempo de coagulación sanguínea de la muestra para determinar el valor de límite no es preferiblemente mayor que el valor del límite superior +50 %, más preferentemente no mayor que el valor del límite superior +20 %, e incluso más preferentemente no mayor que el valor del límite superior +10 %.

Además, puede usarse cualquier plasma positivo a un inhibidor de factores de coagulación que se encuentre en el intervalo anterior y puede usarse plasma débilmente positivo o también puede usarse una serie de diluciones graduales de plasma fuertemente positivo en plasma normal.

También pueden usarse productos disponibles en el comercio como el conocido plasma positivo a inhibidores de factores de coagulación, mencionado anteriormente. Como ejemplos conocidos de productos disponibles en el comercio de plasma positivo a AL se incluyen LATrol (Marca Registrada) (American Diagnostica, Inc.), Control Positivo a Lupus (fabricado por Precision Biologic, Inc.), y Anticoagulante Lúpico de Plasma Humano (George King Bio-Medical, Inc.). Ejemplos conocidos de los productos disponibles en el comercio del inhibidor del factor VIII incluyen Plasma Humano FVIII con Inhibidor (George King Bio-Medical, Inc.) y Plasma Inhibidor de Factor VIII (Technoclone GmbH).

Sin embargo, el valor de límite (proporción de área patrón Y) puede determinarse apropiadamente en cada centro con el que se realiza el ensayo mixto, considerando las diferencias del reactivo usado o el instrumento de medición.

Además, se usa un producto idéntico para el reactivo para medir el tiempo de coagulación sanguínea de una muestra diluida y el reactivo para medir el tiempo de coagulación sanguínea de una persona sana. Como un ejemplo, En la Tabla 1 se presentan los ejemplos del TTPA en el caso de usar Coagpia (marca registrada) APTT-S (fabricado por Sekisui Medical Co., Ltd.; en el presente documento en lo sucesivo, reactivo A) y Thrombocheck APTT-SLA (fabricado por Sysmex Corp.; en lo sucesivo en el presente documento, reactivo B).

[Tabla 1]

	TTPA		
	[unidades: segundos]		
		Reactivo A	Reactivo B
	Intervalo patrón	26,5 a 36,6	24,6 a 35,7
Tasa de dilución	1/4	51,5	43,2
	1/6	46,1	39,9
	1/8	39,9	35,8
	1/10	36,0	33,4
	1/12	35,5	32,8
	1/14	34,3	31,5
	1/16	33,9	30,7

En la Tabla 1, en el caso del reactivo A, la muestra diluida 8 veces presenta un valor TTPA de 39,9 segundos, que es mayor que el intervalo patrón de personas sanas, 36,6 segundos, sirve como la muestra para determinar el valor de límite. En el caso del reactivo B, la muestra diluida 8 veces presenta un valor TTPA de 35,8 segundos, que es mayor que el intervalo patrón de personas sanas, 35,7 segundos sirve como la muestra para determinar el valor de límite. En este caso, el intervalo patrón de personas sanas se obtiene preferentemente procesando estadísticamente el tiempo de coagulación sanguínea de una pluralidad de plasmas de personas sanas, como se describirá más adelante.

La etapa (5) es una etapa para determinar si el plasma de ensayo es de tipo inhibidor de factores de coagulación o del tipo deficiente de factores de coagulación. La proporción del área X se compara con la proporción del área patrón Y, y en el caso en que $Y \leq X$, el plasma de ensayo puede determinarse como el tipo de inhibidor de factores de coagulación, mientras que en el caso en que $Y > X$, el plasma de ensayo puede determinarse como el tipo con déficit de factores de coagulación. Dado que la determinación se basa en una comparación de valores numéricos, la determinación es clara y no requiere destreza. En este caso, el tipo de inhibidor de factor de coagulación implica que la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea es causada por los inhibidores de factores de coagulación analizados anteriormente. El tipo deficiente de factor de coagulación implica que la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea está causado por el déficit de los factores de coagulación.

El área o la proporción de área analizada anteriormente puede calcularse representando realmente un gráfico o similar, pero siempre que se obtengan los mismos resultados de cálculo, el método para calcular el área o la proporción de área no está limitado. Es decir, el instrumento para medir el tiempo de coagulación puede impartirse con una función tal como una que sea capaz de obtener los resultados de cálculo importantes, de tal manera que el cálculo se realiza automáticamente a partir de los resultados del análisis de las muestras.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle a modo de Ejemplos pero la presente invención no pretende estar limitada a éstos.

Ejemplo 1

(1) Determinación de muestras para determinar el valor de límite

Se proporcionaron 50 μ l de cada uno de los especímenes preparados diluyendo un plasma positivo a AL con UN plasma normal de 4 a 16 veces, y 50 μ l cada uno de un reactivo para medir el TTPA se añadió a los mismos. Las mezclas se calentaron a 37 °C durante 3 minutos, y después 50 μ l de cada uno de un líquido de cloruro de calcio se añadió a las mezclas. El tiempo de coagulación se midió usando un analizador de coagulación sanguínea completamente automático, Coapresta (marca registrada) 2000 (comercializado por Sekisui Medical Co., Ltd.).

Se usó control positivo a Lupus como plasma positivo a AL, y se usó plasma normal agrupado como plasma normal (todos fabricados por Precision Biologic, Inc.). Además, se usaron Coagpia (marca registrada) APTT-S (fabricado por Sekisui Medical Co., Ltd.; en lo sucesivo en el presente documento, reactivo A) y ThromboCheck APTT-SLA (fabricado por Sysmex Corp.; en lo sucesivo en el presente documento, el reactivo B) como reactivos para medir el TTPA. Los intervalos convencionales normales de los reactivos se determinaron en base a los valores de medición medidos en 48 personas sanas usando cada uno de los reactivos, y se determinaron como el valor medio $\pm$ 2 DT del

tiempo de coagulación.

Como se muestra en la Tabla 1, en el caso del reactivo A, dado que el espécimen diluido 10 veces dio como resultado un valor TTPA de 36,0 segundos, que estaba dentro del intervalo patrón normal (de 26,5 a 36,6 segundos), se decidió usar el espécimen diluido 8 veces para determinar el valor de límite. Del mismo modo, en el caso del reactivo B, dado que el espécimen diluido 10 veces dio como resultado un valor TTPA de 33,4 segundos, que estaba dentro del intervalo patrón normal (de 24,6 a 35,7 segundos) se decidió usar el espécimen diluido 8 veces para determinar el valor límite.

(2) Realización de ensayo mixto

Se realizó un ensayo mixto de acuerdo con el procedimiento mostrado a continuación, usando el espécimen diluido 8 veces en la sección (1), así como muestras de plasma positivas al AL (especímenes N° 1 a 5), muestras de plasma con déficit del factor de coagulación (especímenes N° 6 y 7) y muestras de plasma de pacientes a los que se administró warfarina (especímenes N° 8 a 10), como se muestra en la Tabla 2.

Se proporcionaron muestras preparadas mezclando un plasma de ensayo y un plasma normal a proporciones de 0, 20, 50 y 100 %, y se midió el tiempo de coagulación usando el reactivo para medir el TTPA descrito en la sección (1).

Posteriormente, se calcularon las proporciones de prolongación del tiempo de coagulación con respecto a una muestra que contenía 0 % de un plasma de ensayo (que contenía solo plasma normal) a partir de los tiempos de coagulación respectivos medidos, y se produjo un gráfico de línea poligonal representando los datos gráficamente, usando al mismo tiempo el eje vertical para representar la proporción de prolongación del tiempo de coagulación y el eje horizontal para representar la proporción del plasma de ensayo.

El área de un polígono formado por una línea diagonal que conecta la proporción de la prolongación del tiempo de coagulación de la muestra que contiene el 100 % de un plasma de ensayo y la proporción de la prolongación del tiempo de coagulación de la muestra que contiene el 0 % de un plasma de ensayo (que contiene solo plasma normal) y por el gráfico de línea poligonal (FIGs. 6, 7 y 8) se calculó restando el área de un triángulo de ángulos rectos que tenía la diagonal como la hipotenusa, del área bajo el gráfico de la línea poligonal. Por tanto, se calculó la proporción del área del polígono con respecto al área del triángulo de ángulos rectos que tiene la línea diagonal como hipotenusa (proporción de área (%)) (Tabla 2).

Las proporciones de área (%) calculadas basándose en los datos de los especímenes diluidos 8 veces se determinaron como los valores de límite de los reactivos respectivos, y cuando la proporción del área de una muestra era igual a o mayor que el valor de límite, la muestra se determinó como del tipo inhibidor de factor de coagulación (en lo sucesivo en el presente documento, puede indicarse simplemente como "tipo de inhibidor"), mientras que cuando la proporción del área de una muestra era menor que el valor de límite, la muestra se determinó como el tipo deficiente de factor de coagulación (en lo sucesivo en el presente documento, puede indicarse simplemente como "tipo deficiente de factor").

En este momento, la proporción de área (%) se calculó mediante dos métodos, tal como un método en el que se usaron 3 puntos para los puntos de medición (proporciones del plasma de ensayo: 0,50 y 100 %) y un método en el que se usaron 4 puntos para los puntos de medición (proporciones del plasma de ensayo: 0,20, 50 y 100 %), y los valores de proporción de área así obtenidos se indican en la tabla como "Invención - 3 puntos" e "Invención - 4 puntos", respectivamente (Tablas 2 y 3).

[Tabla 2]

Reactivo A									
Espécimen Nº	Espécimen	Proporción de plasma de ensayo				Resultados de los cálculos			
		0 %	20 %	50 %	100 %	Inversión – 3 puntos	Inversión – 4 puntos	Método 1 convencional	Método 2 convencional
	Muestra diluida 8 veces	32,2	32,1	33,6	39,9	-31,8 %	-36,1 %		3,5 %
1	Plasma 1 de paciente positivo a AL	32,2	47,2	63,8	81,6	14,0 %	16,4 %	-6,9	38,7 %
2	Plasma 2 de paciente positivo a AL	32,2	44,8	48,0	48,1	49,4 %	69,1 %	-7,8	32,8 %
3	Plasma 3 de paciente positivo a AL	32,2	44,0	55,7	69,3	13,3 %	16,6 %	-5,0	33,9 %
4	Plasma 4 de paciente positivo a AL	32,2	32,7	35,0	44,3	-26,9 %	-29,4 %	3,3	6,3 %
5	Plasma 5 de paciente positivo AL	32,2	33,3	35,9	47,3	-25,5 %	-26,8 %	3,9	7,8 %
6	Plasma de paciente con déficit de Factor VIII	32,2	32,6	34,0	100,5	-47,4 %	-47,6 %	32,4	1,8%
7	Plasma de paciente con déficit de Factor IX	32,2	31,9	32,1	79,1	-50,2 %	-50,5 %	23,6	-0,1 %
8	Plasma 1 de paciente al que se administra warfarina	32,2	31,9	31,8	39,4	-55,6 %	-56,5 %	4,0	-1,0 %
9	Plasma 2 de paciente al que se administra warfarina	32,2	32,5	33,8	43,1	-35,3 %	-36,9 %	3,9	3,7 %
10	Plasma 3 de paciente al que se administra warfarina	32,2	31,7	31,6	43,9	-55,1 %	-56,2 %	6,5	-1,4 %

Ejemplo Comparativo 1 (medición con reactivos AL disponibles en el comercio)

Se realizó un análisis en los especímenes tal como se describe anteriormente (especímenes N° 1 a 5) de acuerdo con un documento adjunto, usando reactivos disponibles en el comercio para medir el AL, ensayo AL de "Gradipore" (fabricado por el Institute Medical Biology) y AL de Staclot (fabricado por F. Hoffmann-La Roche GmbH).

En lo que respecta al ensayo AL de "Gradipore", se calculó la "proporción del tiempo de coagulación" (tiempo de coagulación dl plasma de ensayo/tiempo de coagulación de plasma normal) y una muestra que tenía un valor de la proporción de 1,3 o mayor se determinó como positivo a AL. En lo que respecta a AL de Staclot, se calculó la "diferencia del tiempo de coagulación" (tiempo de coagulación de plasma de ensayo - tiempo de coagulación de plasma normal) y una muestra que tenía un valor de la diferencia de 8 segundos o mayor se determinó como positivo a AL.

Ejemplo Comparativo 2 (determinación de la causa de la prolongación del tiempo de coagulación de acuerdo con el método de ensayo mixto convencional)

Los resultados medidos en la sección (2) se usaron y se aplicaron en las siguientes expresiones para realizar los cálculos.

Método convencional 1: $(a+c)/2-b$

Método convencional 2 (Índice de Rosner): $(b-c)/a$

a: Tiempo de coagulación de plasma de ensayo (segundos)

b: Tiempo de coagulación de muestras que contienen 50 % de plasma de ensayo (segundos)

c: Tiempo de coagulación de muestras que contienen 0 % de plasma de ensayo (segundo)

En el método convencional 1, se determinó una muestra que tenía un valor de 0 o menor como "tipo inhibidor" y en el método convencional 2, una muestra que tenía un valor igual a o mayor que el valor calculado del espécimen diluido 8 veces usado en la sección (1) del Ejemplo 1 como se ha descrito anteriormente, se determinó como "tipo inhibidor".

En la Tabla 3 se presenta una comparación de los resultados del Ejemplo y de los Ejemplos comparativos. Los especímenes fuertemente positivos a AL (especímenes Nos. 1 a 3: positivos tanto para Gradipore como para Staclot) se analizaron con el reactivo A, y como resultado, se determinó que los especímenes eran de "tipo inhibidor", "independientemente de si la determinación se realizaba usando el método de la presente invención o usando uno cualquiera de los métodos convencionales. Sin embargo, en el caso de especímenes débilmente positivos (especímenes Nos. 4 y 5: positivos para uno cualquiera de Gradipore y Staclot), el método convencional 1 no pudo detectar el "tipo inhibidor". Además, se realizó el mismo ensayo sobre especímenes negativos a AL y los especímenes deficientes en factor de coagulación (especímenes Nos. 6 y 7) se determinaron como "tipo deficiente en factor" mediante todos los métodos de cálculo. Sin embargo, en el caso de los especímenes administrados con warfarina (especímenes Nos. 8 a 10), se reconoció una pseudopositividad en el método convencional 2 de tal manera que el espécimen N° 9 se determinó como de "tipo inhibidor", mientras que los métodos de la presente invención (métodos de 3 puntos y de 4 puntos) pudieron determinar el espécimen como el "tipo deficiente en factor" de manera similar tanto para Gradipore como para Staclot. A partir de estos resultados, se descubrió que los métodos de la presente invención podían detectar específicamente el "tipo inhibidor".

[Tabla 3]

Reactivo A							
Especimen Nº		Gradipore	Staclot	Reactivo A			
				Inversión-3 puntos	Inversión-4 puntos	Método convencional 1	Método convencional 2
	Valor de limite	≥ 1,30	≥ 8,0	≥ -31,8 %	≥ -36,1 %	≤0	≥ 3,5 %
1	Plasma 1 de paciente positivo a AL	2,18	31,3	14,0 %	16,4 %	-6,9	38,7 %
2	Plasma 2 de paciente positivo a AL	1,70	14,7	49,4 %	69,1 %	-7,8	32,8 %
3	Plasma 3 de paciente positivo a AL	3,05	60,3	13,3 %	16,6 %	-5,0	33,9 %
4	Plasma 4 de paciente positivo a AL	1,25	8,3	-26,9 %	-29,4 %	3,3	6,3 %
5	Plasma 5 de paciente positivo AL	1,33	1,2	-25,5 %	-26,8 %	3,9	7,8 %
6	Plasma de paciente con déficit de Factor VIII			-47,4 %	-47,6 %	32,4	1,8 %
7	Plasma de paciente con déficit de Factor IX			-50,2 %	-50,5 %	23,6	-0,1 %
8	Plasma 1 de paciente al que se administra warfarina			-55,6 %	-56,5 %	4,0	-1,0 %
9	Plasma 2 de paciente al que se administra warfarina			-35,3 %	-36,9 %	3,9	3,7 %
10	Plasma 3 de paciente al que se administra warfarina			-55,1 %	-56,2 %	6,5	-1,4 %
1	Plasma 1 de paciente positivo a AL	AL+	AL+	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor
2	Plasma 2 de paciente positivo a AL	AL+	AL+	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor
3	Plasma 3 de paciente positivo a AL	AL+	AL+	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor
4	Plasma 4 de paciente positivo a AL		AL+	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor		Tipo inhibidor
5	Plasma 5 de paciente positivo AL	AL+		Tipo inhibidor	Tipo inhibidor		Tipo inhibidor
6	Plasma de paciente con déficit de Factor VIII			Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor		

Reactivo A							
Especimen Nº		Gradipore	Staclot	Reactivo A			
				Invencción-3 puntos	Invencción-4 puntos	Método convencional 1	Método convencional 2
	Valor límite	≥ 1,30	≥ 8,0	≥ -31,8 %	≥ -36,1 %	≤ 0	≥ 3,5 %
7	Plasma de paciente con déficit de Factor IX			Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor		
8	Plasma 1 de paciente al que se administra warfarina			Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor		
9	Plasma 2 de paciente al que se administra warfarina			Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor		Tipo inhibidor
10	Plasma 3 de paciente al que se administra warfarina			Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor		

De manera similar, los resultados obtenidos por un análisis usando el reactivo B se presentan en las Tablas 4 y 5. Los resultados para los especímenes fuertemente positivos a AL (especímenes Nos 1 a 3) se determinaron como el "tipo inhibidor", independientemente de si la determinación se realizaba usando el método de la presente invención o uno cualquiera de los métodos convencionales. Sin embargo, un espécimen débilmente positivo (especimen N° 4),
5 que se había determinado como negativo a AL con Gradipore, se determinó como el "tipo deficiente en factor" de acuerdo con el método de 3 puntos y con el método convencional 1. Sin embargo, cuando el número de puntos de medición aumentó a 4 puntos, el mismo espécimen se determinó como el "tipo inhibidor", y por tanto, se descubrió que el grado de precisión de la determinación se potenciaba.

[Tabla 4]

Reactivo B										
Especimen Nº	Especimen	Proporción de plasma de ensayo				Resultados de los cálculos				
		0 %	20 %	50 %	100 %	Inversión-3 puntos	Inversión-4 puntos	Método convencional 1	Método convencional 2	
	Muestra diluida 8 veces	26,5	27,2	30,6	35,8	-5,9 %	-11,0 %		11,5 %	
1	Plasma 1 de paciente positivo a AL	26,5	40,9	50,4	62,6	16,2 %	22,9 %	-5,9	38,2 %	
2	Plasma 2 de paciente positivo a AL	26,5	37,7	39,3	50,3	3,8 %	16,6 %	-0,9	25,4 %	
3	Plasma 3 de paciente positivo a AL	26,5	35,5	45,6	60,2	6,7 %	8,7 %	-2,3	31,7 %	
4	Plasma 4 de paciente positivo a AL	26,5	28,0	32,2	40,1	-8,1 %	-11,0 %	1,1	14,2 %	
5	Plasma 5 de paciente positivo AL	26,5	31,5	39,0	51,0	1,0 %	1,0 %	-0,3	24,5 %	
6	Plasma de paciente con déficit de Factor VIII	26,5	28,6	32,1	101,9	-42,6 %	-42,7 %	32,1	5,5 %	
7	Plasma de paciente con déficit de Factor IX	26,5	28,2	30,8	90,5	-43,3 %	-43,3 %	27,7	4,8 %	
8	Plasma 1 de paciente al que se administra warfarina	26,5	27,4	29,2	41,5	-32,0 %	-32,6 %	4,8	6,5 %	
9	Plasma 2 de paciente al que se administra warfarina	26,5	27,4	29,8	39,5	-24,6 %	-26,2 %	3,2	8,4 %	
10	Plasma 3 de paciente al que se administra warfarina	26,5	27,1	28,9	46,1	-37,8 %	-38,7 %	7,4	5,2 %	

[Tabla 5]

Reactivo B		Reactivo B				
Espécimen N°.		Gradipore	Stadlot	Punto 3 de la invención	Punto 4 de la invención	Método 1 convencional
	Valor límite	≥1,30	≥ 8,0	≥ -5,9 %	≥-11,0 %	≥ 11,5 %
1	Plasma 1 de paciente positivo a AL	2,18	31,3	16,2 %	22,9 %	38,2 %
2	Plasma 2 de paciente positivo a AL	1,70	14,7	3,8 %	16,6 %	25,4 %
3	Plasma 3 de paciente positivo a AL	3,05	60,3	6,7 %	8,7 %	31,7 %
4	Plasma 4 de paciente positivo a AL	1,25	8,3	-8,1 %	-11,0 %	14,2 %
5	Plasma 5 de paciente positivo a AL	1,33	1,2	1,0 %	1,0 %	24,5 %
6	Plasma de paciente con déficit de Factor VIII			-42,6 %	-42,7 %	5,5 %
7	Plasma de paciente con déficit de Factor IX			-43,3 %	-43,3 %	4,8 %
8	Plasma 1 de paciente al que se administra warfarina			-32,0 %	-32,6 %	6,5 %
9	Plasma 2 de paciente al que se administra warfarina			-24,6 %	-26,2 %	8,4 %
10	Plasma 3 de paciente al que se administra warfarina			-37,8 %	-38,7 %	5,2 %
1	Plasma 1 de paciente positivo a AL	LA+	LA+	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor
2	Plasma 2 de paciente positivo a AL	LA+	LA+	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor
3	Plasma 3 de paciente positivo a AL	LA+	LA+	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor
4	Plasma 4 de paciente positivo a AL		LA+	Tipo deficiente en factor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor
5	Plasma 5 de paciente positivo a AL	LA+		Tipo inhibidor	Tipo inhibidor	Tipo inhibidor
6	Plasma de paciente con déficit de factor VIII			Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor	

Reactivo B		Reactivo B				
Especimen N°.		Gradipore	Staclot	Punto 3 de la invencción	Punto 4 de la invencción	Método 1 convencional
				≥ -5,9 %	≥ -11,0 %	≥ 11,5 %
7	Valor de límite Plasma de paciente con déficit de factor IX	≥ 1,30	≥ 8,0	Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor	≤0
8	Plasma 1 de paciente al que se administra warfarina			Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor	
9	Plasma 2 de paciente al que se administra warfarina			Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor	
10	Plasma 3 de paciente al que se administra warfarina			Tipo deficiente en factor	Tipo deficiente en factor	

REIVINDICACIONES

1. Un método de determinación de una causa de la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea en plasma de ensayo, comprendiendo el método:

- 5 (1) medir los tiempos de coagulación sanguínea de muestras que incluyen (a) solo plasma del ensayo, (b) solo plasma normal, y (c) el plasma de ensayo y el plasma normal mezclados al menos a una proporción de mezcla;
(2) dibujar un gráfico de línea poligonal representando gráficamente los resultados de medición de las muestras (a), (b) y (c), representando un eje vertical el tiempo de coagulación sanguínea o una proporción de prolongación
10 del tiempo de coagulación sanguínea y representando el eje horizontal la relación de mezcla o la proporción de mezcla del plasma de ensayo o del plasma normal, y por lo tanto determinando un área A bajo la línea poligonal y un área B bajo el segmento de la línea que conecta los resultados de medición representados gráficamente de las muestras (a) y (b);
(3) calcular una proporción del área (A-B) obtenida restando el área B del área A, con respecto al área B, $((A-B)/B)$; proporción de área X);
15 (4) realizar las etapas de (1) y (2) para un plasma positivo a un inhibidor de factores de coagulación y de este modo determinando de antemano la proporción de área patrón Y; y
(5) comparar la proporción de área X y la proporción de área patrón Y, y determinar el plasma de ensayo como un tipo de inhibidor de factor de coagulación en el caso en el que $Y \leq X$, o un tipo deficiente en factor de
20 coagulación en el caso en el que $Y > X$.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la proporción de área patrón Y para el plasma positivo a un inhibidor de factores de coagulación es un valor determinado con respecto a un plasma positivo al inhibidor de factores de coagulación que presenta un tiempo de coagulación sanguínea que es mayor que el límite superior de un intervalo patrón que se ha obtenido procesando estadísticamente el tiempo de coagulación sanguínea de una pluralidad de
25 plasmas de personas sanas, y no es mayor que un valor de límite superior +50 %.

3. El método de la reivindicación 2, en el que el intervalo patrón para el tiempo de coagulación sanguínea de plasmas de personas sanas se obtiene procesando estadísticamente el tiempo de coagulación sanguínea de una pluralidad de plasmas de personas sanas.
30

4. El método de la reivindicación 1, en el que cuando el eje vertical X se usa para representar el tiempo de coagulación sanguínea en (2) de la reivindicación 1, los valores obtenidos restando un número constante del mismo se usan para el área A y para el área B.
35

5. El método de la reivindicación 4, en el que el número constante se obtiene dibujando una línea auxiliar paralela al eje horizontal y a través del punto del tiempo de coagulación sanguínea representado gráficamente del plasma normal dibujado en el gráfico de línea poligonal, y calculando el área bajo la línea auxiliar.

40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tiempo de coagulación sanguínea es al menos uno seleccionado de TP (tiempo de protrombina), TTPA (tiempo de tromboplastina parcial activada), TPd (TP diluida), TTPAd (TTPA diluida), TCC (tiempo de coagulación con caolín), y TVVRd (tiempo del veneno de la víbora de Russell diluido).

45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el inhibidor de factores de coagulación es al menos uno seleccionado de anticoagulante lúpico (AL), un inhibidor del factor VIII, un inhibidor del factor IX, y un inhibidor del factor V.

Fig. 1

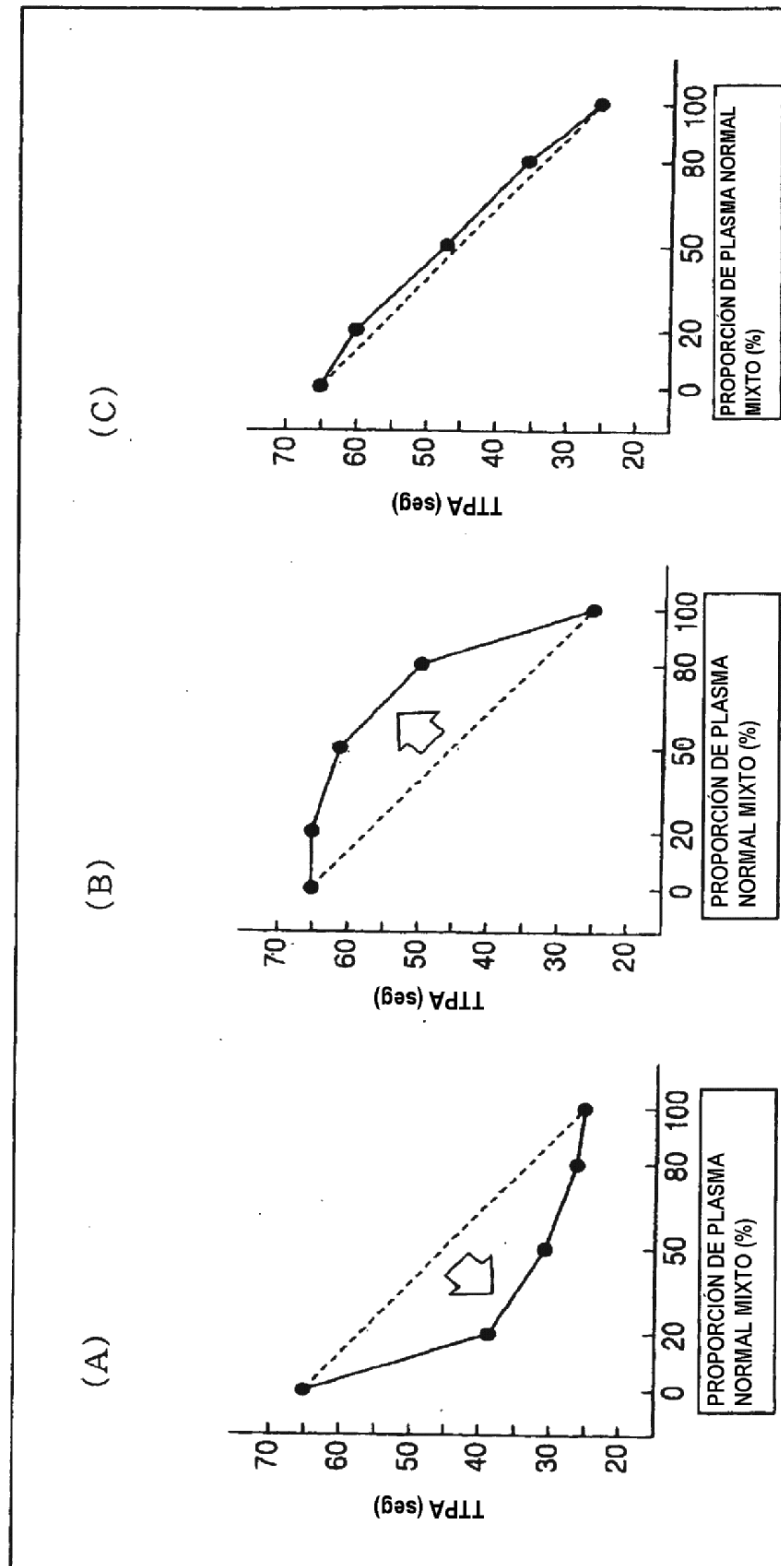


Fig. 2

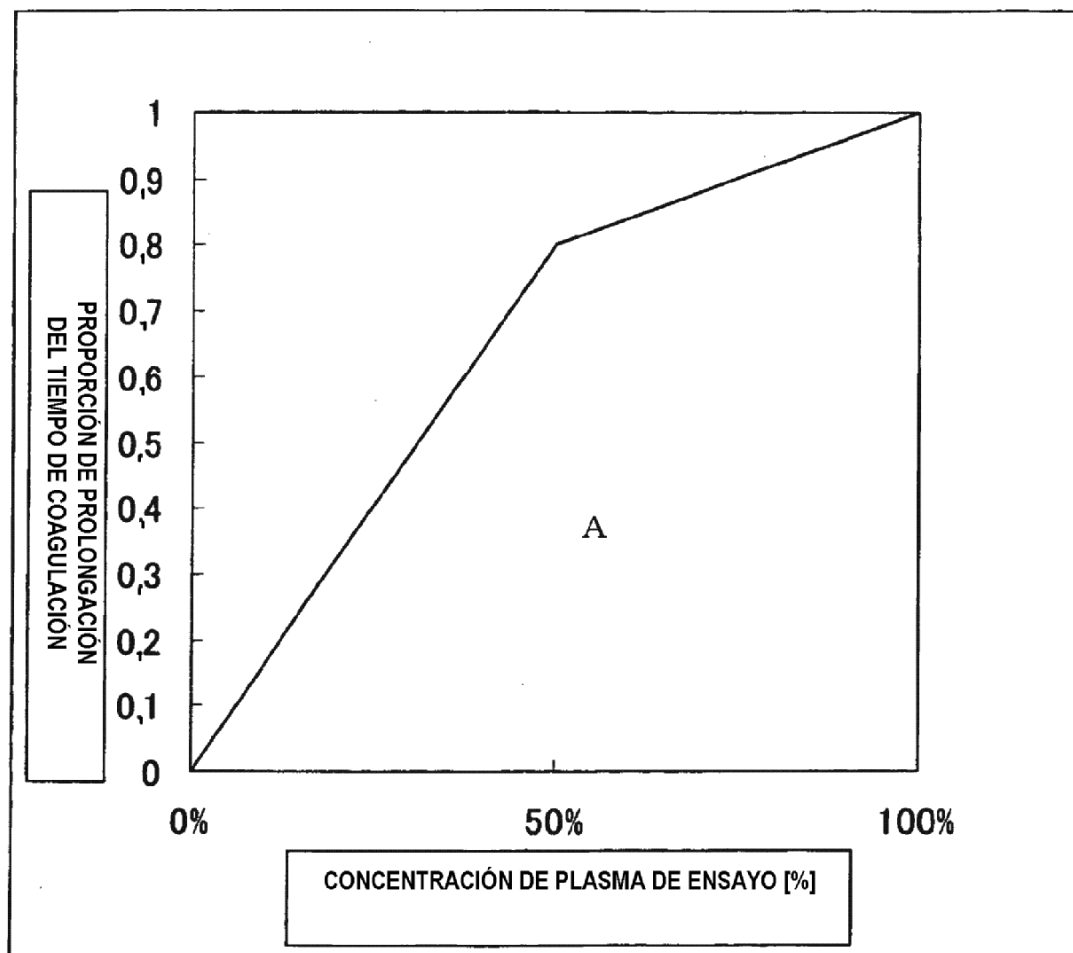


Fig. 3

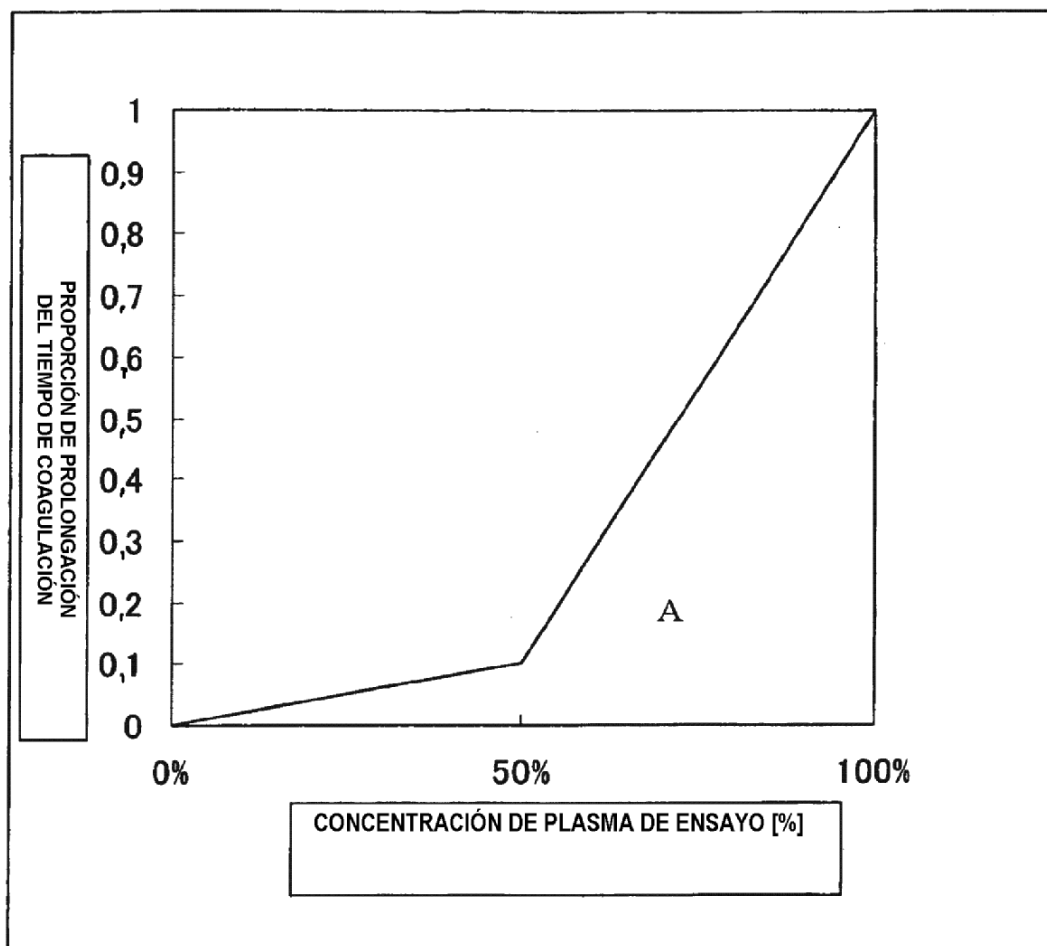


Fig. 4

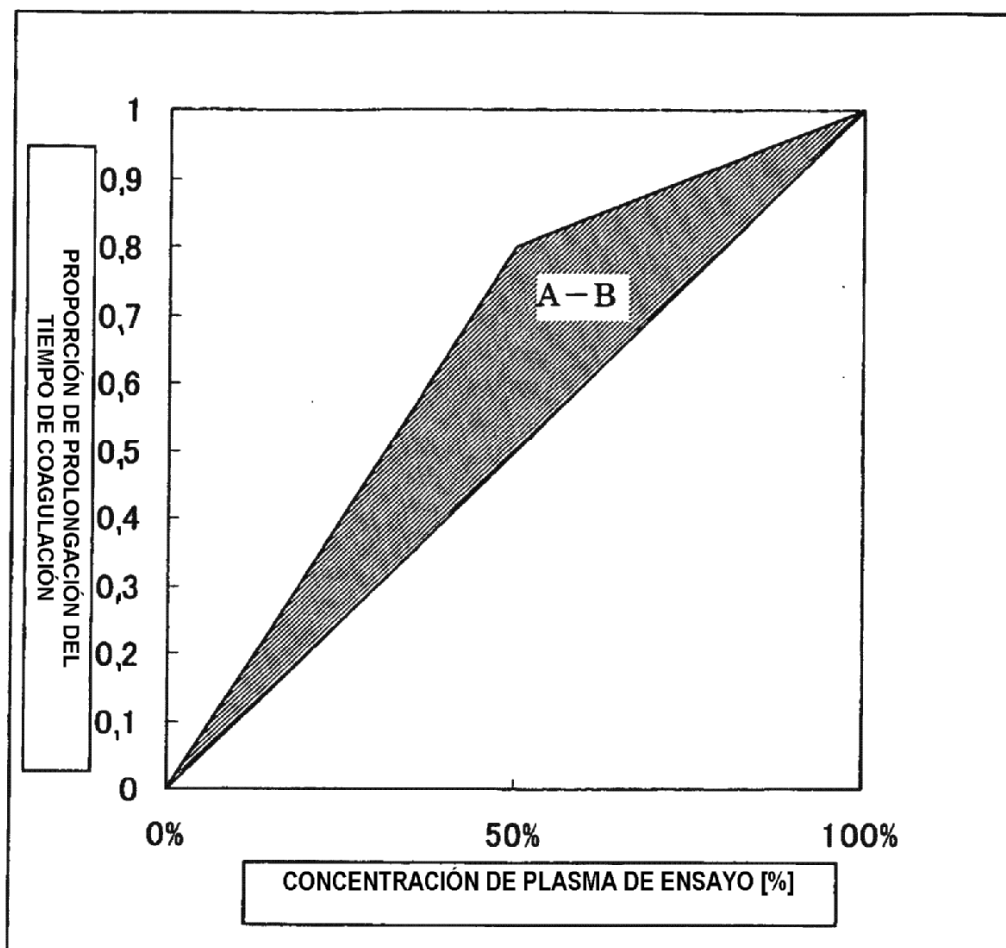


Fig. 5

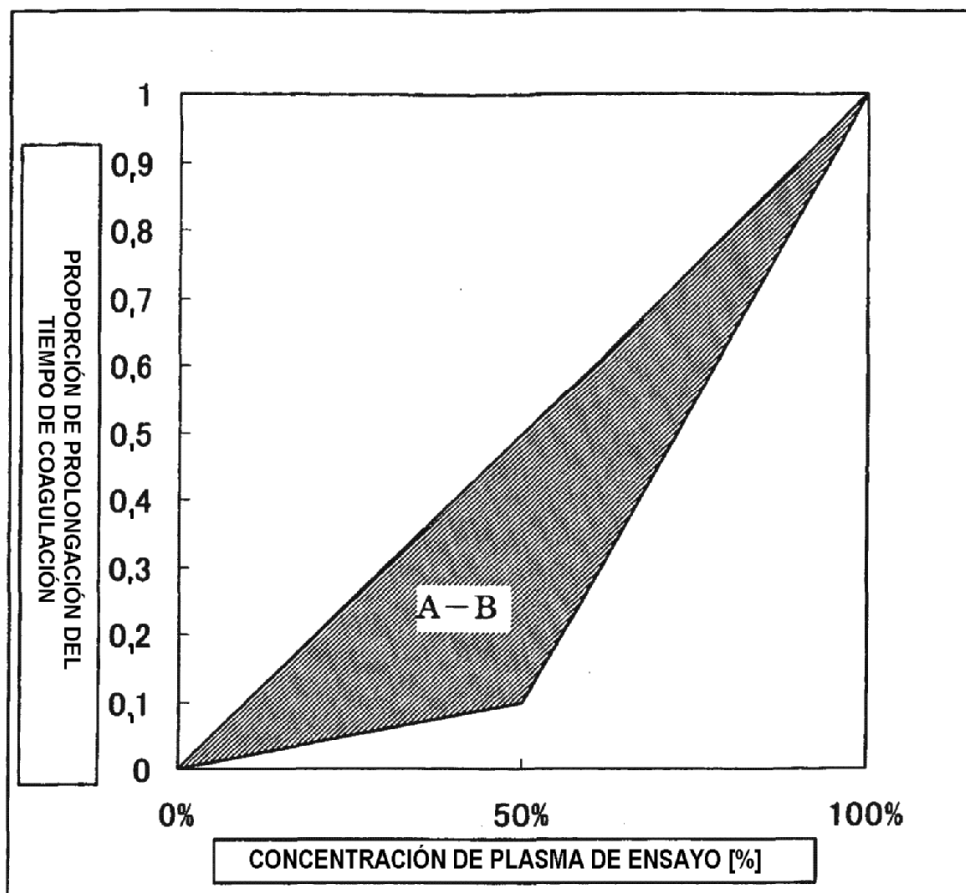


Fig. 6

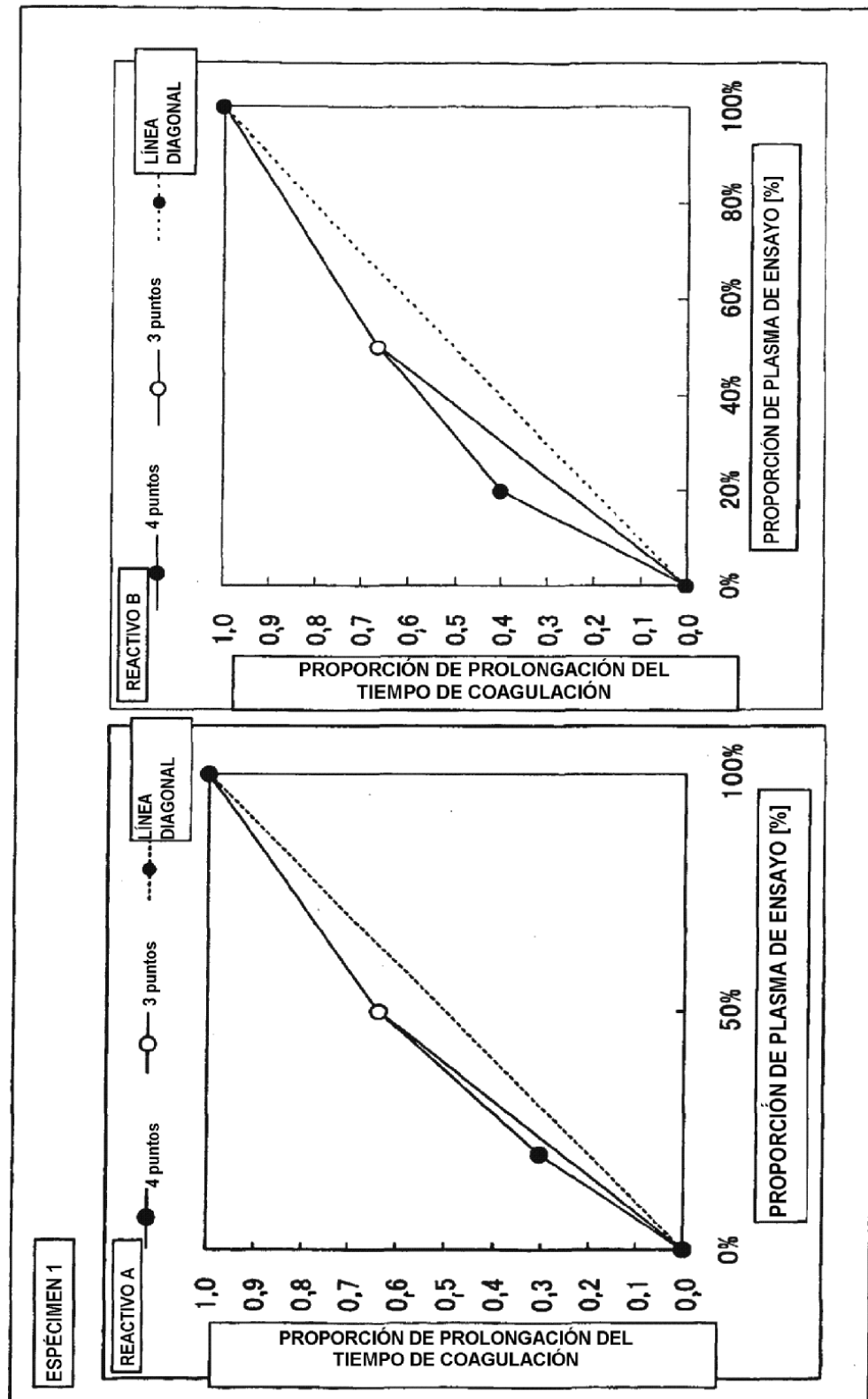


Fig. 7

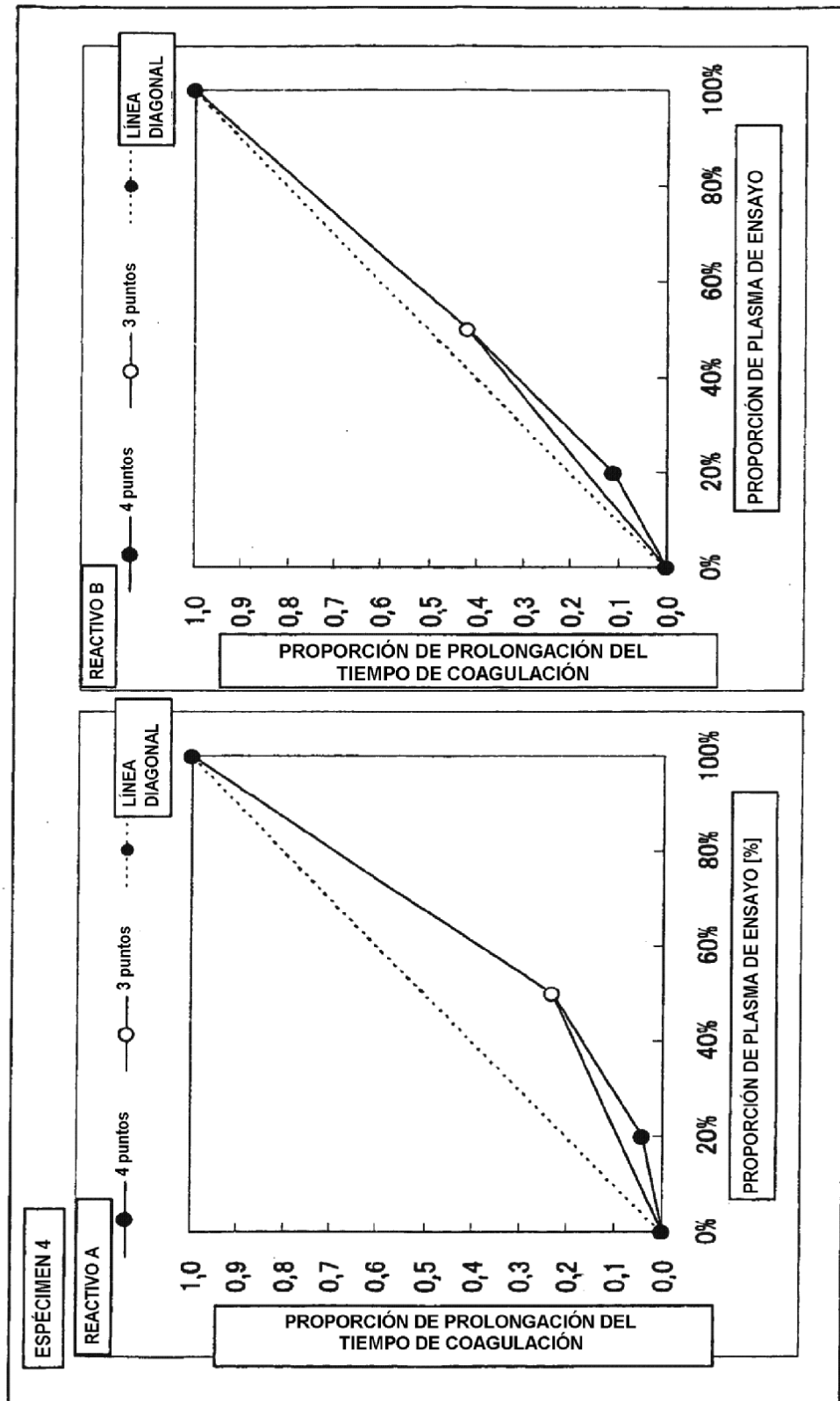


Fig. 8

