



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

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

(11)



1-0033913

(51)⁷ G01N 33/49; B01L 3/00

(13) B

(21) 1-2017-01241

(22) 09/09/2015

(86) PCT/US2015/049198 09/09/2015

(87) WO2016/040490 17/03/2016

(30) 62/048,183 09/09/2014 US

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/07/2017 352A

(73) Perosphere Technologies Inc. (US)

108 Mill Plain Road, Suite 301, Danbury, CT 06811, United States of America

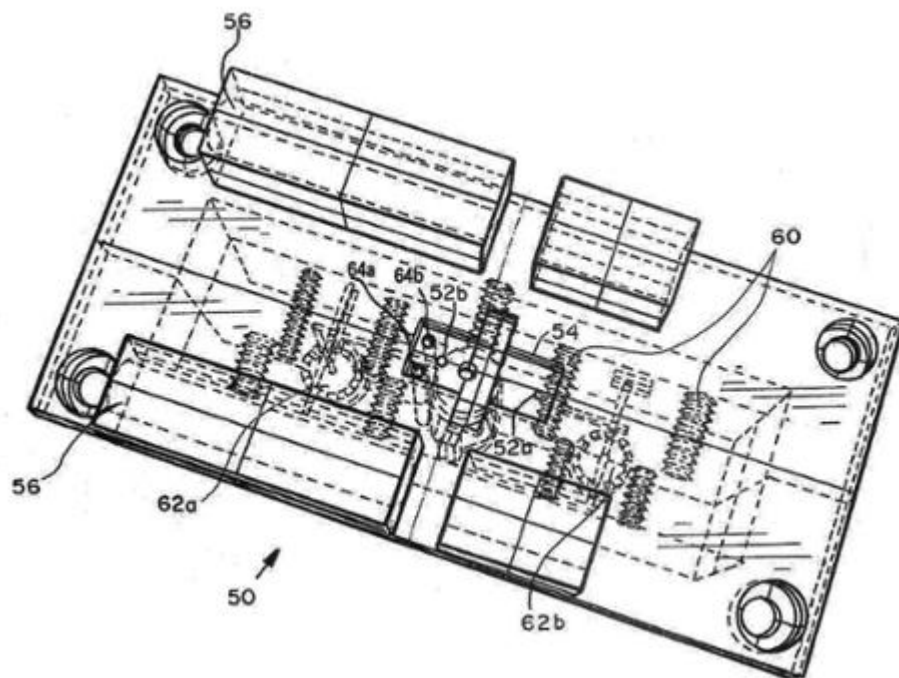
(72) BAKHRU, Sasha (US); LAULICHT, Bryan (US); ZAPPE, Stefan (US); STEINER, Solomon (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) THIẾT BỊ VI THỬ NGHIỆM, VI CHIP THỬ NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐO THỜI GIAN ĐÔNG MÁU

(57) Sáng chế đề cập đến thiết bị thử nghiệm trên cơ sở chip vi lưu đã được phát triển để đo các đặc tính vật lý của chất phân tích (cụ thể là, máu toàn phần hoặc các dẫn xuất của máu toàn phần). Các công nghệ có thể được áp dụng để đo thời gian đông máu của máu toàn phần hoặc các dẫn xuất của máu, xác định hiệu quả của thuốc chống đông máu trên động lực vón cục/đông máu, cũng như đánh giá hiệu quả của tác nhân đảo ngược tác dụng chống đông máu. Các công nghệ này có thể còn được sử dụng để tối ưu hóa phân liều của thuốc chống đông máu và/hoặc các tác nhân đảo ngược của chúng. Thử nghiệm là độc lập với sự có mặt của tác nhân chống đông máu; đông máu được hoạt hóa bằng cách việc để lộ của mẫu máu trong thiết bị ra bề mặt thủy tinh (hoặc vật liệu mang điện âm khác như là silic được oxy hóa), mà hoạt hóa con đường nội sinh và có thể nhanh chóng hơn nữa bằng cách áp dụng dòng cắt ngang qua bề mặt vật liệu hoạt hóa. Sự không có mặt của tác nhân là hóa chất hoạt hóa và vi môi trường được kiểm soát cao và tái tạo được tạo ra thử nghiệm đông máu phổ thông tại chỗ.

Phần lắp ráp ở đáy, phiên bản đóng



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thiết bị thử nghiệm đông máu phổ thông tại chỗ dựa vào chip vi lưu và đầu đọc mà có thể được sử dụng để đo tình trạng đông máu tổng quan của người bệnh có bệnh sức khỏe thông thường, đông máu được làm suy yếu, được chống đông, và được đảo ngược để chống đông máu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đông máu (vón cục) là quy trình nhờ đó máu thay đổi từ lỏng thành gel. Nó tiềm năng dẫn đến cầm máu, dừng mất máu từ mạch bị hư hại, tiếp theo là hồi phục. Cơ chế của đông máu bao gồm hoạt hóa, bám dính, và tích tụ tiểu cầu cùng với chuyển hóa fibrinogen thành fibrin, mà lắng đọng và trưởng thành thành mạng mạnh. Rối loạn đông máu là tình trạng bệnh mà có thể dẫn đến chảy máu hoặc đông máu tắc nghẽn (huyết khối).

Đông máu bắt đầu rất nhanh sau khi tổn thương đến mạch máu có bị hư hại nội mô làm đầy mạch. Việc để lộ của máu ra khoảng không dưới nội mô làm khởi đầu hai loại quy trình: thay đổi ở trong tiểu cầu, và việc để lộ yếu tố mô dưới nội mô thành Yếu tố huyết tương VII, mà kết cục là dẫn đến hình thành fibrin. Tiểu cầu ngay lập tức hình thành nút chặn ở vị trí tổn thương; điều này được gọi là cầm máu sơ cấp. Cầm máu thứ cấp xuất hiện đồng thời: yếu tố đông máu bổ sung hoặc yếu tố đông máu tùy thuộc vào Yếu tố VII, đáp ứng với chuỗi yếu tố phức để hình thành sợi fibrin, mà làm mạnh nút chặn tiểu cầu.

Chuỗi yếu tố đông máu của cầm máu thứ cấp có hai con đường mà dẫn đến hình thành fibrin. Đó là con đường hoạt hóa qua tiếp xúc (còn được biết đến là con đường nội sinh), và con đường yếu tố mô (còn được biết đến là con đường ngoại sinh). Trước đây người ta cho rằng, chuỗi yếu tố đông máu được tạo thành từ hai con đường quan trọng như nhau được kết nối vào con đường chung. Giờ đây đã biết rằng, con đường sơ cấp để bắt đầu đông máu là con đường yếu tố mô. Con đường là hàng loạt các phản ứng, trong đó tiền enzym (tiền chất enzym bất hoạt) của serin proteaza và đồng yếu tố glycoprotein của nó được hoạt hóa để trở thành các thành phần hoạt hóa

mà sau đó xúc tác phản ứng tiếp theo trong chuỗi yếu tố, kết cục là tạo ra fibrin liên kết chéo. Yếu tố đông máu thường được xác định bằng số La mã, với trường hợp viết thường bằng mao từ không xác định được gắn vào là để chỉ ra dạng hoạt hóa.

Yếu tố đông máu thường là serin proteaza mà tác động bằng cách phân cách các protein xuôi dòng. Có một số ngoại lệ. Ví dụ, FVIII và FV là các glycoprotein, và Yếu tố XIII là transglutaminaza. Yếu tố đông máu tuân hoàn như tiền enzym bất hoạt. Chuỗi yếu tố đông máu được chia theo phân loại thành ba con đường. Yếu tố mô và con đường hoạt hóa qua tiếp xúc cả hai hoạt hóa "con đường chung cuối cùng" của yếu tố X, trombin và fibrin.

Con đường yếu tố mô (ngoại sinh)

Vai trò chính của con đường yếu tố mô là để tạo ra "bùng nổ trombin", quá trình nhờ đó trombin, thành phần cấu thành quan trọng nhất của chuỗi yếu tố đông máu về vai trò hoạt hóa phản hồi của nó, được giải phóng rất nhanh. FVIIa tuân hoàn ở lượng cao hơn so với yếu tố đông máu được hoạt hóa bất kỳ khác. Quá trình này gồm có các bước sau:

Sau khi làm tổn thương mạch máu, FVII rời khỏi chu kỳ và đi vào tiếp xúc với yếu tố mô (TF) được biểu hiện trên tế bào mang yếu tố mô (nguyên bào sợi liên kết và bạch cầu), hình thành phức được hoạt hóa (TF-FVIIa).

TF-FVIIa hoạt hóa FIX và FX.

FVII tự nó được hoạt hóa bằng trombin, FXIa, FXII và FXa.

Sự hoạt hóa FX (để hình thành FXa) bằng TF-FVIIa gần như ngay lập tức được ức chế bằng tác nhân ức chế con đường yếu tố mô (TFPI).

FXa và đồng yếu tố FVa của nó hình thành dạng phức protrombinaza, mà hoạt hóa protrombin thành trombin.

Sau đó trombin hoạt hóa khác các thành phần của chuỗi yếu tố đông máu, gồm có FV và FVIII (mà hoạt hóa FXI, mà, đến lượt nó, hoạt hóa FIX), và hoạt hóa và giải phóng FVIII khỏi bị liên kết vào vWF.

FVIIIa là đồng yếu tố của FIXa, và cùng với chúng hình thành phức “tenaza”, mà hoạt hóa FX; và do vậy mà chu trình tiếp tục. (“Tenaza” là dạng rút gọn của “10” và hậu tố “-aza” được sử dụng cho enzym.)

Con đường hoạt hóa qua tiếp xúc (nội sinh)

Con đường hoạt hóa qua tiếp xúc bắt đầu với việc hình thành phức sơ cấp trên collagen bằng kininogen trọng lượng phân tử cao (HMWK), prekallikrein, và FXII (yếu tố Hageman). Prekallikrein được chuyển hóa thành kallikrein và FXII trở thành FXIIa. FXIIa chuyển hóa FXI thành FXIa. Yếu tố XIa hoạt hóa FIX, mà với đồng yếu tố FVIIIa của nó hình thành phức tenaza, mà hoạt hóa FX thành FXa. Vai trò thứ yếu mà con đường hoạt hóa qua tiếp xúc có khi khởi đầu sự hình thành đông máu có thể được minh họa bằng thực tế là người bệnh bị thiếu hụt trầm trọng FXII, HMWK, và prekallikrein không có rối loạn chảy máu. Thay vào đó, hệ thống hoạt hóa tiếp xúc có vẻ như liên quan nhiều hơn đến chứng viêm.

Thử nghiệm đông máu

Một số kỹ thuật, gồm có các thử nghiệm trên cơ sở đông máu, thử nghiệm nhiễm sắc hoặc tạo màu, các phép đo hóa học trực tiếp, và ELISA, được sử dụng để tiến hành thử nghiệm đông máu. Trong số các kỹ thuật này, thử nghiệm trên cơ sở đông máu và tạo sắc được sử dụng thường xuyên nhất. Trong khi thử nghiệm đông máu cho phép đánh giá tổng quan về chức năng đông máu, các thử nghiệm nhiễm sắc được thiết kế để đo mức độ hoặc chức năng của các yếu tố đặc hiệu.

Thử nghiệm trên cơ sở đông máu thường được sử dụng để đánh giá người bệnh bị chảy máu bất thường giả định và để theo dõi liệu pháp chống đông máu. Hầu hết trong số các thử nghiệm này sử dụng huyết tương được xitrat hóa, mà cần vài chục phút để chuẩn bị và thường cần vài giờ đến vài ngày để thu được các kết quả trong môi trường bệnh viện. Điểm đầu đối với hầu hết các thử nghiệm đông máu là hình thành đông máu fibrin.

Thời gian protrombin (PT) được tiến hành bằng cách bổ sung chất phản ứng thromboplastin mà chứa yếu tố mô (mà có thể là dạng tái tổ hợp nguyên gốc hoặc được dẫn xuất từ phần chiết của não, phổi, hoặc nhau thai) và canxi vào huyết tương và đo thời gian đông máu. PT biến thiên với chất phản ứng và máy đo đông máu nhưng thường nằm trong khoảng từ 10 đến 14 giây. PT được kéo dài với sự thiếu hụt

của các yếu tố VII, X, và V, protrombin, hoặc fibrinogen và bởi các kháng thể định hướng đối lại các yếu tố này. Thử nghiệm này cũng là bất thường ở người bệnh với các tác nhân ức chế của phản ứng fibrinogen thành fibrin, gồm có liều dùng heparin cao và sự có mặt của sản phẩm thoái hóa fibrin. Thông thường, chất phản ứng PT chứa dư phospholipit sao cho các tác nhân ức chế không đặc hiệu (tức là, chất chống đông luput), mà phản ứng với phospholipit anion, không kéo dài thời gian đông máu. PT được sử dụng thường xuyên nhất để phát hiện liệu pháp warfarin. Việc đo PT là không so sánh được giữa các thiết bị hoặc các trung tâm và hầu hết các phòng khám warfarin phát triển khoảng người bệnh thông thường của họ, mà không thể chuyển được và đặc hiệu cao đối với các chất phản ứng chính xác có mặt trong thử nghiệm đặc hiệu được sử dụng.

Thử nghiệm thời gian thromboplastin từng phần hoạt hóa (aPTT) được tiến hành bằng cách trước tiên bổ sung chất hoạt động bề mặt (ví dụ, cao lanh, xelit, ellagic axit, hoặc silica) và phospholipit được pha loãng (ví dụ, xephalin) vào huyết tương được xitrat hóa. Ở tại chỗ, aPTT còn có thể đo được trong máu toàn phần thường sử dụng tác nhân hoạt hóa hóa chất tương tự. Phospholipit trong thử nghiệm này được gọi là thromboplastin từng phần bởi vì không có yếu tố mô. Sau khi ủ để cho phép hoạt hóa tối ưu các yếu tố tiếp xúc (yếu tố XII, yếu tố XI, prekallikrein, và kininogen trọng lượng phân tử cao), sau đó thêm canxi vào, và đo thời gian đông máu. Việc đo aPTT là không so sánh được giữa các thiết bị hoặc các bệnh viện và hầu hết các phòng thí nghiệm lâm sàng phát triển khoảng người bệnh thông thường của họ, mà không thể chuyển được và đặc hiệu cao đối với các chất phản ứng chính xác có mặt trong thử nghiệm đặc hiệu được sử dụng.

Mặc dù thời gian đông máu biến thiên theo chất phản ứng và máy đo đông máu được sử dụng, aPTT thường nằm trong khoảng từ 22 đến 40 giây. aPTT có thể được kéo dài với sự thiếu hụt của các yếu tố tiếp xúc; các yếu tố IX, VIII, X, hoặc V; protrombin; hoặc fibrinogen. Các tác nhân ức chế yếu tố đặc hiệu, cũng như các tác nhân ức chế không đặc hiệu, còn có thể kéo dài aPTT. Sản phẩm thoái hóa fibrin và tác nhân chống đông máu (ví dụ, heparin, các tác nhân ức chế trombin trực tiếp, hoặc warfarin) cũng kéo dài aPTT, mặc dù aPTT kém nhạy với warfarin hơn so với PT.

Thời gian đông máu trombin (TCT) được tiến hành bằng cách bổ sung trombin dư vào huyết tương. TCT được kéo dài ở người bệnh với mức độ fibrinogen thấp hoặc rối loạn fibrinogen máu và ở người bệnh với mức độ sản phẩm thoái hóa fibrin tăng. Những bất thường này thường thấy được với đông máu trong mạch xâm lấn. TCT cũng được kéo dài bằng heparin và các tác nhân ức chế trombin trực tiếp.

Thời gian đông máu được hoạt hóa (ACT) là thử nghiệm đông máu toàn phần tại chỗ được sử dụng để phát hiện liệu pháp heparin liều dùng cao hoặc điều trị với bivalirudin. Liều dùng của heparin hoặc bivalirudin cần trong những xử lý này là tùy thuộc vào khoảng có thể đo được với aPTT. Thông thường, máu toàn phần được gom vào trong ống hoặc hộp chứa chất hoạt hóa đông máu (ví dụ, các hạt xelit, cao lạnh, hoặc thủy tinh) và thanh khuấy từ, và sau đó đo thời gian cần để máu đông. Giá trị tham khảo đối với ACT nằm trong khoảng từ 70 đến 180 giây. Khoảng mong muốn để chống đông máu phụ thuộc vào chỉ số và phương pháp thử nghiệm được sử dụng. ACT cũng không tương quan với các thử nghiệm đông máu khác.

Đối với thời gian đông máu ecarin (ECT), nọc độc từ rắn *Echis carinatus* được sử dụng để chuyển protrombin thành meizotrombin, chất trung gian protrombin mà nhạy đối với ức chế bằng cách các tác nhân ức chế trombin trực tiếp. ECT không thể được sử dụng để phát hiện trạng thái của đông máu bị xáo trộn và chỉ hữu dụng để phát hiện thuốc chữa bệnh. Thử nghiệm này không nhạy với heparin bởi vì sự cản trở không gian ngăn phức heparin-antitrombin khỏi ức chế meizotrombin. Bởi vì ecarin cũng hoạt hóa protrombin không được cacboxyl hóa được phát hiện ra trong huyết tương của người bệnh được điều trị warfarin, mức độ của các tác nhân ức chế trombin trực tiếp có thể được thử nghiệm thậm chí với điều trị warfarin đồng thời. Mặc dù ECT đã được sử dụng trong nghiên cứu tiền lâm sàng, thử nghiệm vẫn còn chưa được chuẩn hóa và không có mặt rộng rãi.

Thử nghiệm kháng yếu tố Xa được sử dụng để đo mức độ của heparin và heparin trọng lượng phân tử thấp (LMWH). Đây là thử nghiệm nhiễm sắc mà sử dụng chất nền yếu tố Xa trên đó nhóm mang màu được liên kết. Yếu tố Xa phân cách chất nền nhiễm sắc, giải phóng hợp chất mang màu mà có thể được phát hiện với phổ quang kế và trực tiếp tỷ lệ thuận với lượng của yếu tố Xa có mặt. Khi lượng đã được biết đến của yếu tố Xa được bổ sung vào huyết tương chứa heparin (hoặc LMWH),

heparin tăng cường ức chế yếu tố Xa bằng cách dẫn antitrombin ít yếu tố Xa có mặt để phân cách chất nền. Bằng cách tạo tương quan kết quả này với đường cong tiêu chuẩn được tạo ra với lượng đã biết của heparin, có thể tính nồng độ heparin trong huyết tương. Việc sử dụng thử nghiệm kháng Xa đòi hỏi hiểu biết về chống đông máu mà người bệnh nhận để sử dụng bộ định chuẩn thích hợp và không thể được sử dụng để phát hiện liệu pháp chống đông máu kháng IIa.

Thuốc chống đông máu trong sử dụng lâm sàng gồm có warfarin, heparin (heparin không phân đoạn và LMWH), và các tác nhân ức chế trombin trực tiếp (bivalirudin, hirudin, và argatroban).

Warfarin có tác dụng đối với ngăn ngừa sơ cấp và thứ cấp của tắc huyết khối tĩnh mạch; để ngăn ngừa biến cố nghẽn mạch tim ở người bệnh với rung nhĩ hoặc van tim nhân tạo; để ngăn ngừa đột quỵ, nhồi máu tái phát, hoặc tử vong do bệnh tim mạch ở người bệnh với nhồi máu cơ tim cấp; và đối với ngăn ngừa sơ cấp của nhồi máu cơ tim cấp ở người có rủi ro cao. Bởi vì tính biến thiên trong chống đông máu đáp ứng với warfarin, mà phản ánh biến dị di truyền trong chuyển hóa và các yếu tố môi trường như là thuốc chữa bệnh, chế độ ăn, và bệnh đồng mắc, phát hiện đông máu thông thường và điều chỉnh phân liều được yêu cầu duy trì chỉ số máu bình thường quốc tế (INR) trong phạm vi khoảng trị liệu. Heparin là tác nhân chống đông máu gián tiếp mà hoạt hóa antitrombin và xúc tiến khả năng của nó để bất hoạt trombin và yếu tố Xa. Để xúc tác ức chế trombin, heparin liên kết vào cả antitrombin nhờ trình tự pentasacarit ái lực cao và trombin. Ngược lại, để thúc đẩy ức chế yếu tố Xa, heparin chỉ cần liên kết vào antitrombin nhờ trình tự pentasacarit của nó. Các phân tử heparin chứa <18 đơn vị sacarit là quá ngắn để liên kết vào cả trombin và antitrombin và do đó không thể xúc tác ức chế trombin. Tuy nhiên, các đoạn heparin ngắn hơn này có thể xúc tác ức chế yếu tố Xa, với điều kiện chúng chứa trình tự pentasacarit. Việc chống đông máu đáp ứng với heparin là không dự đoán được bởi vì liên kết không đặc hiệu biến thiên với các tế bào màng trong, đơn bào, và các protein huyết tương. Do đáp ứng chống đông máu biến thiên này, phát hiện đông máu được tiến hành như thông thường khi heparin được đưa ra ở mức lớn hơn so với liều dùng dự phòng. aPTT là thử nghiệm thường xuyên nhất được sử dụng để phát hiện heparin. Tuy nhiên, các chất phản ứng aPTT biến thiên trong đáp ứng của chúng với heparin, và khoảng liều pháp aPTT khác nhau, phụ thuộc vào tính nhạy cảm của chất phản ứng và máy đo đông máu được sử dụng

cho thử nghiệm. aPTT đã cho thấy là khó để tiêu chuẩn hóa hơn so với PT, và thường nằm trong khoảng trị liệu từ 1,5 đến 2,5 lần giá trị kiểm soát thường xuyên dẫn đến việc dùng toàn thân liều dùng heparin dưới mức chữa bệnh. Bằng chứng hỗ trợ khái niệm về khoảng aPTT trị liệu mà dự báo hiệu quả và an toàn (so với chảy máu) có phần mong manh. Khoảng 25% người bệnh cần liều dùng heparin bằng >35 000 U/d để thu được aPTT trị liệu và được gọi là kháng heparin. Hầu hết trong số người bệnh này có các mức heparin trị liệu khi đo được với thử nghiệm kháng Xa, và sự không nhất quán giữa 2 thử nghiệm là kết quả của nồng độ thuốc đông máu cao như là fibrinogen và yếu tố VIII, mà rút ngắn aPTT. Mặc dù aPTT đáp ứng là tuyến tính với các mức heparin trong phạm vi khoảng trị liệu, aPTT trở thành không thể đo được với các liều dùng heparin cao hơn. Do đó, thử nghiệm kém nhạy của tác nhân chống đông máu tổng quan như là ACT được sử dụng để phát hiện mức độ chống đông máu ở người bệnh trải qua can thiệp động mạch vành qua da hoặc phẫu thuật bắc cầu nối máu cơ tim.

LMWH dẫn xuất từ heparin không phân đoạn bằng cách khử trùng hợp hóa học hoặc enzym. LMWH đã dần thay thế heparin đối với hầu hết các chỉ số. LMWH thường dùng ở liều dùng cố định khi được đưa ra đối với các mục đích phòng ngừa hoặc ở liều dùng được điều chỉnh theo trọng lượng khi được đưa ra để điều trị. Những khó khăn trong việc phát hiện của LMWH bằng các mức độ kháng yếu tố Xa gồm có tính tương thích kém giữa các thử nghiệm nhiễm sắc kháng Xa có trên thị trường, sự khác biệt về tỷ lệ của kháng Xa so với kháng IIa trong số các chế phẩm LMWH khác nhau, và tầm quan trọng của việc định thời gian của lấy mẫu máu so với liều dùng. Mặc dù aPTT có thể được kéo dài với liều dùng LMWH cao, thử nghiệm này không được sử dụng cho việc phát hiện. Đến nay không có thử nghiệm tại chỗ dùng cho lâm sàng để phát hiện cho hàng triệu người bệnh dùng LMWH.

Các tác nhân ức chế trombin trực tiếp liên kết trực tiếp với trombin và chặn tương tác của trombin với chất nền của nó. Ba tác nhân ức chế trombin trực tiếp gốc được cấp phép cho các chỉ số được giới hạn ở Bắc Mỹ. Hirudin và argatroban được chấp nhận để điều trị cho người bệnh mắc giảm tiểu cầu do heparin, trong khi bivalirudin được cấp phép là dạng thay thế cho heparin ở người bệnh trải qua can thiệp động mạch vành qua da (PCI). Hirudin và argatroban đòi hỏi phát hiện thông thường. TCT quá nhạy với lượng nhỏ của hirudin và argatroban để được sử dụng cho mục đích

này. Mặc dù ACT đã được sử dụng để phát hiện liều dùng cao hơn của các tác nhân ức chế trombin trực tiếp được cần trong xử lý can thiệp, nó không tạo ra đáp ứng tuyến tính tối ưu ở các nồng độ cao. aPTT được đề xuất để việc phát hiện liệu pháp chữa bệnh; tuy nhiên, từng chất ức chế trombin trực tiếp có đáp ứng liều dùng riêng của nó, và tính nhạy cảm của thử nghiệm đối với các thay đổi về mức độ của thuốc giữa các chất phản ứng aPTT. Khi liệu pháp hirudin được phát hiện với aPTT, liều dùng được điều chỉnh để giữ aPTT nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2,5 lần kiểm soát, trong khi đối với argatroban, aPTT đích nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3 lần kiểm soát (nhưng không vượt quá 100 giây). aPTT thể hiện là kém hữu dụng ở người bệnh cần liều dùng chất ức chế trombin trực tiếp cao hơn trong phẫu thuật bắc cầu nối chủ vành bởi vì thử nghiệm này trở thành đáp ứng kém ở các nồng độ thuốc tăng. ECT xuất hiện là hữu dụng đối với cả nồng độ thấp và nồng độ cao của các tác nhân ức chế trombin trực tiếp và ít bị tác động bởi can thiệp các cơ chất hơn so với aPTT. Tuy nhiên, như đã nêu trên đây, nó không có được một cách thông thường. Tính đáp ứng của INR với các nồng độ thuốc khác nhau sẽ khác với chất phản ứng thử nghiệm và với dạng của chất ức chế trombin trực tiếp. Dấu hiệu này làm phức tạp việc chuyển tiếp người bệnh mắc giảm tiểu cầu do heparin từ argatroban thành chất đối kháng vitamin K.

Rõ ràng từ phần mô tả trên đây, đông máu, và việc ức chế đông máu, là quy trình phức tạp. Dạng tác nhân chống đông máu có thể dẫn đến các kết quả sai lệch và nguy hiểm nếu được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm đông máu sai. Điều này tạo ra tình huống thảm khốc tiềm tàng khi người bệnh được chống đông máu đi đến phòng cấp cứu mà không có thông tin về thuốc mà người bệnh đang dùng, cũng như điều kiện điều trị. Đôi khi không thể chờ đợi đối với chẩn đoán thêm để xác định chống đông máu hoặc rối loạn gây ra chảy máu kéo dài. Cần có thử nghiệm đông máu nhanh, chính xác và phổ thông, đặc biệt là thử nghiệm tại chỗ ("POC"), là đã được biết đến; tuy nhiên, các lựa chọn là rất giới hạn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, một mục đích của sáng chế là đề xuất thử nghiệm đông máu nhanh, chính xác và phổ thông.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thử nghiệm đông máu tại chỗ.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thử nghiệm chính xác, tái tạo được, dễ vận hành, và cần lượng mẫu rất nhỏ.

Thiết bị thử nghiệm trên cơ sở chip vi lưu đã được phát triển để đo các đặc tính vật lý của chất phân tích (cụ thể là, máu toàn phần hoặc các dẫn xuất của máu toàn phần). Cụ thể là, công nghệ có thể được áp dụng để đo thời gian đông máu của máu toàn phần hoặc các dẫn xuất của máu, để xác định hiệu quả của thuốc chống đông máu trên động lực vón cục/đông máu, cũng như để đánh giá hiệu quả của tác nhân đảo ngược chống đông máu. Các công nghệ này có thể còn được sử dụng để tối ưu hóa phân liều của thuốc chống đông máu và/hoặc các tác nhân đảo ngược của chúng. Thử nghiệm là độc lập với sự có mặt của tác nhân chống đông máu vì đông máu được hoạt hóa bằng cách việc để lộ của mẫu máu trong thiết bị ra bề mặt thủy tinh (hoặc vật liệu mang điện âm khác như là silic được oxy hóa), mà hoạt hóa con đường nội sinh và có thể nhanh hơn nữa bằng cách áp dụng dòng cắt ngang qua bề mặt vật liệu hoạt hóa. Sự không có mặt của tác nhân hoạt hóa chất hoạt hóa và vi môi trường được kiểm soát cao và tái tạo tạo ra thử nghiệm đông máu phổ thông tại chỗ.

Mẫu được xử lý trong hệ vi lưu. Thể tích của mẫu được đưa vào trong buồng thử nghiệm ở trong khoảng nano-, micro-, hoặc mililít (tốt nhất là 1-10 mililít). Mẫu được đưa vào trong giếng gom trực tiếp từ mẫu máu hoặc cá nhân (như là từ chích đầu ngón tay). Theo một phương án, mẫu, như là máu hoặc huyết tương, được gom và được chuyển đến vi thiết bị được gia nhiệt ngay sau khi gom bằng bơm tiêm vào trong ống nắp đỏ không phụ gia hoặc ống mao dẫn. Đông máu trong mẫu, tốt hơn là trong các mẫu lặp, được bắt đầu bằng cách việc để lộ của máu hoặc huyết tương ra bề mặt thủy tinh trong thiết bị và mẫu được để lộ đến ra phương tiện phân tích của đông máu. Sau đó, mẫu máu được lấy từ giếng gom vào buồng thử hoặc thụ động bằng tác động của mao dẫn hoặc bằng bơm, mà được kéo lên và để lộ mẫu máu ra bề mặt vật liệu hoạt hóa, trong khi phân phối lượng mẫu máu được kiểm soát hình học vào trong buồng thử. Hệ vi lưu cùng với điện cực tích hợp, cấu trúc bộ gia nhiệt hoặc các phần khác của cảm biến hoặc bộ xử lý được thiết kế để dùng một lần. Hệ vi lưu được lồng vào trong hốc phân tích dùng lại được (sau đây gọi là “đầu đọc”) mà là một phần của thiết bị phân tích, kết nối hệ vi lưu và tạo ra giao diện chất lưu, điện, quang và nhiệt để đo đông máu và chuyển thời gian và các đặc tính của giá trị đo đến đầu đọc, bộ phát hiện, hoặc bộ ghi bên ngoài.

Đánh giá việc đông máu bằng cách thay đổi về độ nhớt, sự truyền quang, trở kháng điện, và/hoặc áp suất. Theo phương án được ưu tiên, đông máu được phát hiện thông qua việc đo trở kháng của máu thông qua điện cực tích hợp và/hoặc thông qua việc đo sự truyền quang sử dụng LED hồng ngoại (IR) và điốt quang, tương ứng. Cấu trúc bộ gia nhiệt/bộ làm mát nhiệt trở suất tích hợp như bơm gia nhiệt thể rắn hoặc bộ làm mát Peltier giữ mẫu máu ở nhiệt độ được xác định, tốt nhất là khoảng 37°C (nhiệt độ cơ thể), và đảm bảo khả năng lặp lại và tương thích của các phép đo. Do fibrinogen chuyển hóa thành fibrin, sự hấp thụ IR tăng cho đến khi đạt đỉnh theo cách đo được. Việc xác định thời gian đông máu của máu toàn phần được thực hiện tại hoặc quanh đỉnh hấp thụ IR. Sau khi hoàn thành đo, chip vi lưu chứa mẫu máu được lấy ra khỏi đầu đọc và bỏ đi.

Việc phát triển đông máu có thể được phát hiện bằng cách đo trở kháng điện. Phát triển của fibrin làm tăng trở kháng điện cho đến khi nó đạt đỉnh theo cách đo được. Tại hoặc quanh đỉnh trở kháng điện, việc xác định thời gian đông máu của máu toàn phần được thực hiện. Thời gian đông máu của máu toàn phần có thể đo được bằng cách hấp thụ IR và trở kháng điện được đo riêng hoặc đồng thời làm cơ sở để so sánh. Trở kháng điện và đường cong hấp thụ IR cơ bản là trùng, và cho phép xác nhận thông qua các phương thức đo độc lập.

Hệ vi lưu được sản xuất bằng cách áp dụng các vi công nghệ và xử lý và liên kết các tấm mỏng được làm từ silic, thủy tinh hoặc vật liệu thích hợp khác. Hệ vi lưu còn có thể được sản xuất bằng các phương pháp tùy ý, ví dụ, bằng cách áp dụng công nghệ khắc mềm hoặc bằng cách tạo ra các phần của đầu đọc (được tạo từ, ví dụ, chất dẻo hoặc vật liệu mờ IR cơ bản, thích hợp khác) mà có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp với chip được tạo vi mẫu để tạo thành hệ vi lưu. Hệ vi lưu thường gồm có cửa vào, cửa ra và một hoặc nhiều buồng mà được kết nối thông qua các rãnh, chiều dài nằm trong khoảng từ vài chục micromét đến milimet, với chiều cao và chiều sâu nằm trong khoảng từ vài chục micromét đến vài trăm micromét.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ sơ đồ chuỗi yếu tố đông máu.

Hình 2A là hình vẽ mặt cắt ngang một phương án của thiết bị vi lưu, trong đó máu được hút pipet vào trong một buồng, và sau đó chip được lồng vào trong bao gói.

Hình 2B là hình vẽ mặt cắt ngang phương án của thiết bị vi lưu nơi mà máu có thể được đưa vào thông qua cạnh buồng; “bộ nháp” chọc ngoài đầu đọc, tương tự với cách đo glucoza trong máu.

Hình 3A là hình vẽ thể hiện phiên bản mở của hai thiết bị buồng mẫu.

Hình 3B là hình vẽ thể hiện phiên bản đóng của hai thiết bị buồng mẫu.

Các hình vẽ Hình 4A-4H là các hình vẽ các buồng thể hiện các buồng, các rãnh kết nối, các dải tiếp xúc điện, và nhiệt kế điện tử.

Hình 5 là hình vẽ phối cảnh nhìn từ trên xuống đáy của đầu đọc phiên bản đóng.

Hình 6 là hình vẽ mặt cắt ngang mặt bên của đáy của đầu đọc phiên bản đóng.

Hình 7 là hình vẽ mặt cắt ngang phối cảnh của đỉnh của đầu đọc phiên bản đóng thể hiện thiết bị thử nghiệm mẫu đang thực hiện.

Hình 8 là hình vẽ mặt cắt ngang phối cảnh từ trên xuống của đỉnh đầu đọc phiên bản đóng.

Hình 9A là hình vẽ mặt cắt ngang phối cảnh từ trên xuống của phần đáy của đầu đọc phiên bản mở.

Hình 9B là hình vẽ mặt cắt ngang phối cảnh từ mặt bên của phần đáy của đầu đọc phiên bản mở.

Hình 10A là hình vẽ mặt cắt ngang phối cảnh từ mặt bên và từ dưới lên đỉnh của đầu đọc phiên bản mở.

Hình 10B là hình vẽ mặt cắt ngang phối cảnh từ mặt bên và từ trên xuống đỉnh của đầu đọc phiên bản mở.

Hình 11 là hình vẽ sơ đồ hệ thống, thể hiện hộp chứa buồng thử nghiệm dùng một lần, đầu đọc, và các kết nối vào bộ xử lý máy tính và bộ phát hiện.

Các hình vẽ Hình 12A-12F thể hiện đồ thị của trở kháng (12A, 12C, và 12E) và sự truyền hồng ngoại (12B, 12D, 12F) trong thời gian bằng phút để kiểm soát không chống đông máu, 300 ng tác nhân chống đông máu edoxaban/ml máu, và 300 ng edoxaban và xiraparantag (PER977; tác nhân đảo ngược chống đông máu)/ml máu, tương ứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Các định nghĩa

Vi lưu

Vi lưu là lĩnh vực liên ngành cao, liên quan đến thiết kế, vật lý, hóa học, sinh hóa, công nghệ micro/nano, và công nghệ sinh học. Thể tích nhỏ của chất lỏng, nằm trong khoảng từ femto đến mililit thường được xử lý trong hệ vi lưu. Phương pháp để tạo ra hệ vi lưu thường cho phép tích hợp các cảm biến và/hoặc bộ xử lý, sao cho chất lỏng có thể được chuyển, thao tác và phân tích một cách hiệu quả bên trong hệ vi lưu. Giao diện giữa hệ vi lưu và môi trường của nó cho phép thực hiện bên ngoài cơ chế để vận chuyển, thao tác và phân tích.

Công nghệ micro/nano

Công nghệ micro/nano thường được sử dụng để tạo ra vi hệ thống, bao gồm hệ vi lưu. Công nghệ micro/nano thường cho phép tạo ra các cấu trúc với kích thước nằm trong khoảng micro hoặc nanomet. Công nghệ này có thể dựa trên công nghệ xử lý tấm mỏng silic, đầu tiên được phát triển để chế tạo của mạch điện tử tích hợp.

Tác động mao dẫn

Cách thuận tiện để nạp mẫu lỏng vào trong hệ vi lưu là bằng tác động mao dẫn. Cổng gom mẫu được làm ướt bằng mẫu và mẫu được hút một cách hiệu quả vào trong rãnh thủy lực, hẹp và các buồng của hệ vi lưu bằng các lực mao dẫn.

Tác nhân chống đông máu

Tác nhân chống đông máu là cơ chất mà gây cản trở cho khả năng đông của máu. Dùng làm thuốc chữa bệnh, một tác nhân chống đông máu có thể, ví dụ, giúp làm giảm hoặc ngăn ngừa sự xuất hiện của vật nghẽn mạch hoặc cục huyết khối đe dọa tiềm tàng đến sức khỏe và/hoặc tính mạng.

Tác nhân đảo ngược chống đông máu

Tác nhân đảo ngược chống đông máu có thể được dùng làm thuốc chữa bệnh để đảo ngược một phần hoặc toàn bộ hiệu quả của tác nhân chống đông máu. Việc khôi phục lại khả năng đông của máu có thể cứu sống tính mạng, ví dụ, người bệnh dùng tác nhân chống đông máu và đang có tổn thương trầm trọng có thể được điều trị với

chất phản ứng đảo ngược để khôi phục lại khả năng đông máu và ngăn ngừa mất quá nhiều máu.

Thiết bị “mở” và “đóng”

Một thiết bị “mở” có rãnh ra bên ngoài từ buồng bên trong, cho phép đưa trực tiếp máu vào trong buồng. Một thiết bị “đóng” không có các rãnh bên ngoài, và được làm đầy trước khi được đóng kín ra bên ngoài trừ các lỗ nhỏ nối với các cảm biến, điện cực, LEDs, và các yếu tố khác được sử dụng trong việc đánh giá đông máu trong buồng. 'Phiên bản mở' của hệ vi lưu được thiết kế sao cho chip có thể được lồng vào trong bao gói từ trước, được gia nhiệt, nhưng vẫn có thể tiếp cận được (mở). Mẫu có thể được nạp vào hệ thống thông qua việc làm ướt cổng bên, với chip đã nằm trong bao gói. Mẫu sẽ được hút vào trong chip bằng các lực mao dẫn.

“Phiên bản đóng” của hệ vi lưu sẽ là không tiếp cận được đối với người dùng sau khi nó được đặt vào trong bao gói. Mẫu phải được nạp vào trong hệ thống trước khi đặt chip vào trong bao gói thông qua việc làm ướt của hoặc hút pipet vào trong một trong các cổng bên phía sau.

II. Thiết bị

Các phương án của chip vi lưu và đầu đọc của nó được thể hiện trên các Hình 2-10, với hệ thống bao gồm cả phần được thể hiện trên Hình 11. Như được chỉ ra trên các Hình Hình 2A và 2B, chip vi lưu 10 được sản xuất thông qua khắc ướt không đẳng hướng tấm mỏng silic và oxy hóa nhiệt sau đó, khắc ướt đẳng hướng tấm mỏng PYREX® (thủy tinh bosilicat trong, giãn nhiệt thấp), lớp lắng đọng phủ của màng kim loại mỏng trên cả hai tấm mỏng thông qua khuôn in, liên kết anốt tấm mỏng silic và PYREX®, và sau đó tách rời các chip đơn bằng cách vạch ô tấm mỏng.

Chip vi lưu có thể được sản xuất bằng cách các thiết bị tùy ý, sử dụng phương pháp bất kỳ thích hợp để tạo ra cấu trúc vi lưu và vật liệu mang điện âm bất kỳ thích hợp để hoạt hóa chuỗi yếu tố đông máu.

Kích thước mặt cắt ngang và hình học của buồng 12a và 12b và rãnh 14 nối với buồng có thể thay đổi, và số lượng buồng có thể thay đổi. Tỷ lệ bề mặt so với thể tích sẽ ảnh hưởng toàn bộ thời gian đông máu. Tiếp cận buồng là trực tiếp (“đóng”, Hình

2B), trước khi tới bít kín buồng thiết bị, hoặc thông qua rãnh bên 16 mà cho phép tiếp cận từ bên ngoài vi buồng.

Như được thể hiện bởi các Hình 3A và 3B, chip được thiết kế để cho phép:

- Gia nhiệt thông qua điện trở mặt sau hoặc cấu trúc gia nhiệt bằng điện (trên mặt dưới của buồng 12a và 12b)
- Đo nhiệt độ để gia nhiệt kiểm soát thông qua mặt trên (ngoài) nhiệt kế điện tử 18
- Phát hiện đông máu thông qua việc đo áp suất không khí
- Phát hiện đông máu thông qua việc đo kháng trở qua mẫu máu thông qua điện cực cài sẵn 20a và đệm tiếp xúc 20b
- Phát hiện đông máu thông qua đo quang học

Như được thể hiện trên các Hình 4A-4H, các cấu trúc điện trở 22 được lắng phủ lên trên mặt sau của tấm mỏng silic 24 (để tạo thành cấu trúc gia nhiệt có điện trở 32, các Hình 4G, 4H), trên mặt trước 26 của tấm mỏng silic (để tạo thành điện cực 20a, 20b để đo kháng trở và nhiệt kế điện tử 18, tương ứng, ở sàn của từng buồng), và trên mặt trước của tấm mỏng PYREX® (để tạo thành nhiệt kế điện tử 18 trên đỉnh của một hoặc cả hai buồng 12a, 12b). Bộ gia nhiệt và nhiệt kế điện tử có thể ở bên ngoài so với “chip”, và có thể được tích hợp vào trong cấu trúc đầu đọc. Nếu các thành của khoang mà chip được đặt vào trong đó có khối lượng lớn hơn đáng kể so với chip, dẫn nhiệt cao, và tạo thành phần bao quanh gần như hoàn toàn, khi đó khoang gần như “thân đen” và chip phải đạt cân bằng nhiệt với khoang. Nếu chip tiếp xúc với khoang, hoặc không gian đóng kín, hằng số thời gian cân bằng có thể là rất ngắn. Điều này có thể được thiết lập bằng cách đo bằng hỏa kế trong quá trình phát triển. Điều này có thể làm giảm độ phức tạp của phần dùng một lần của hệ thống, và chi phí. Rãnh nối 14 và cổng vào 36 có thể được khắc bằng kali hydroxit (KOH) lên tấm mỏng silic 26.

Thiết bị trên Hình 2B, 3B (được gọi là “thiết bị đóng”) có hai cổng vào 28a, 28b được khắc qua phần silic 30. Mẫu có thể được hút pipet vào một trong các cổng 28a, 28b trước khi thiết bị 10 được lồng vào trong bao gói bít kín. Thiết bị trên các Hình 2a, 3b có một cổng vào 28b được khắc qua phần silic và một cổng vào ngang 16, được thực hiện như rãnh được khắc vào PYREX® (được gọi là “thiết bị

mở”). Trong trường hợp chất nền silic, cấu trúc dạng sóng bề mặt có thể được tích hợp trực tiếp vào thiết kế vi lưu bằng kỹ thuật vi chế tạo đã được biết đến. Chip của thiết bị mở (các Hình 2A, 3A) có thể được lồng trước vào trong bao gói bít kín và/hoặc đầu đọc, với mép cổng ngang chọc ra ngoài đầu đọc. Việc làm ướt cổng ngang 16 khi đó sẽ dẫn đến mẫu được hút vào buồng 12a bằng tác động mao dẫn.

Hệ thống kiểm soát bộ gia nhiệt/bộ làm mát kết hợp và nhiệt kế điện tử có thể ở bên ngoài so với “chip”, và có thể được tích hợp vào cấu trúc đầu đọc. Nếu các thành của khoang, mà chip được đặt vào trong đó, có khối lượng lớn hơn đáng kể so với chip, dẫn nhiệt cao, và tạo thành bao quanh gần như hoàn toàn, khi đó khoang gần như là “thân đen” và chip phải đạt cân bằng nhiệt với khoang. Nếu chip tiếp xúc với khoang, hoặc không gian gần, hằng số thời gian cân bằng có thể là rất ngắn. Điều này có thể được thiết lập bằng cách đo bằng hỏa kế trong quá trình phát triển. Điều này sẽ làm giảm độ phức tạp của phần dùng một lần của hệ thống và (hy vọng) giảm chi phí.

Bộ sản phẩm chip hoặc “đầu đọc” như được thể hiện trên các Hình 5-10, tạo ra giao diện điện, quang và chất lưu cho chip. Đầu đọc gồm có phần đáy (các Hình 5, 6, 9A, 9B) và phần đỉnh (các Hình 7, 8, 10A, 10B) được sản xuất bằng cách in 3D chính xác cao, đúc, gia công, hoặc các quy trình sản xuất khác. Cả hai phần được nối và được ép vào nhau bằng cách khóa các đỉnh chốt kim loại mà khớp vào các lỗ 56. Đầu đọc có thể bao gồm các thiết bị để hiển thị, lưu trữ thông tin, và có khả năng liên lạc.

Các Hình 5 và 6 thể hiện phần đáy đầu đọc 50 đối với thiết bị chip đóng từ hai góc khác nhau. Các rãnh 52a, 52b, được bố trí trong hốc 54, bên trong đầu đọc nối các buồng 2 và 1, tương ứng, với các cổng vào của chip. Ở một bên của đầu đọc, van sôlêlôit (không được thể hiện trên hình vẽ) có thể được gắn vào đầu đọc ở đầu rãnh 58 để kiểm soát kết nối giữa rãnh đầu đọc và bộ kết nối ống chặn được vít vào đáy của đầu đọc. Ở phía đối diện, cảm biến áp suất (không được thể hiện trên hình vẽ) có thể được gắn vào đầu đọc ở các lỗ 60 để phát hiện áp suất áp lên rãnh đầu đọc và cổng vào của chip. Mỗi cổng vào 62a, 62b được kiểm soát/được phát hiện bởi van sôlêlôit/cảm biến áp suất của nó được bắt chặt ở các lỗ 70a, 70b, 70c, và 70d. Phần đáy đầu đọc thể hiện hốc 54 cho chip vi lưu. Lỗ nhỏ thẳng đứng 64a, 64b giữ chốt đứng tiếp xúc với cấu trúc bộ gia nhiệt ở đáy của chip. Lỗ 66 ở tâm của phần đầu đọc giữ chip IR LED trong đầu đọc dạng hộp kim loại, mà đi qua theo đường đi của ánh sáng 68.

Các thành phần IR có thể được đúc hoặc tích hợp thành dạng “hệ chip”.

Mặc dù thể hiện là giá trị đo quang điểm đơn, giá trị đo quang nhiều điểm cũng có thể được sử dụng.

Các Hình 7 và 8 thể hiện phần đỉnh đầu đọc 80 đối với thiết bị chip đóng từ hai góc khác nhau. Lỗ rộng (ví dụ, 5mm) 82 ở tâm giữ chip điốt quang IR (không được thể hiện trên hình vẽ) trong đầu đọc dạng hộp kim loại mà dẫn ánh sáng qua lỗ 86. Ba lỗ thẳng đứng nhỏ (ví dụ, nhỏ hơn một mm) 84 giữ ba chốt đứng (không được thể hiện trên hình vẽ) tiếp xúc ba điện cực để đo trở kháng (một điện cực tiếp đất chung cho cả hai buồng và một điện cực đối trong mỗi buồng), sao cho việc đo trở kháng có thể được tiến hành ở cả hai buồng. Hai lỗ thẳng đứng khác 88 giữ chốt đứng tiếp xúc với nhiệt kế điện tử trên đỉnh của chip. Các phương án khác của thiết bị này là đã được biết đến và đã có cho cùng chức năng. IR LED và điốt quang được đặt sao cho chúng cắt vắn vùng tâm đường kính 1mm của một buồng.

Đầu đọc chip tự nó được gắn vào vỏ của hộp dự án 100 mà chứa mạch điện tử, van, và bơm cần để thực hiện các phép đo tự động, như được thể hiện trên Hình 11. Hộp dự án 100 được kết nối vào PC 102 nơi mà việc đo được kiểm soát bởi chương trình LabView và bộ xử lý 110, và các kết quả được thể hiện trên màn hình 104.

Các Hình 9A và 9B thể hiện phần đáy đầu đọc 120 đối với thiết bị chip mở từ hai góc khác nhau. Các đỉnh chốt 122 được sử dụng để siết chặt thiết bị. Các rãnh 124 bên trong đầu đọc nối các buồng 2 và 1, tương ứng, với các cổng vào của chip. Ở một bên của đầu đọc, van sôlêlôit (không được thể hiện trên hình vẽ) có thể được gắn vào đầu đọc ở đầu rãnh để kiểm soát kết nối giữa rãnh đầu đọc và bộ kết nối ống chặn được vít vào đáy của đầu đọc. Ở phía đối diện, cảm biến áp suất (không được thể hiện trên hình vẽ) có thể được gắn vào đầu đọc ở các lỗ 126a, 126b để phát hiện áp suất áp lên rãnh đầu đọc và cổng vào của chip. Mỗi cổng vào được kiểm soát/được phát hiện bởi van sôlêlôit/cảm biến áp suất của nó được bắt chặt ở các lỗ. Phần đáy đầu đọc thể hiện hốc 128 cho chip vi lưu. Lỗ 130 ở tâm của phần đầu đọc giữ chip IR LED trong đầu đọc dạng hộp kim loại.

Các Hình 10A và 10B thể hiện phần đỉnh của đầu đọc 140 đối với thiết bị chip mở từ hai góc khác nhau. Lỗ rộng (ví dụ, 5mm) 142 ở tâm giữ chip điốt quang IR (không được thể hiện trên hình vẽ) trong đầu đọc dạng hộp kim loại mà dẫn ánh sáng

qua lỗ 144. Ba lỗ thẳng đứng nhỏ (ví dụ, nhỏ hơn một mm) 146 giữ ba chốt đứng (không được thể hiện trên hình vẽ) tiếp xúc với ba điện cực để đo trở kháng (một điện cực tiếp đất chung cho cả hai buồng và một điện cực đối trong mỗi buồng), sao cho việc đo trở kháng có thể được thực hiện trong cả hai buồng. Hai lỗ thẳng đứng khác 148 giữ chốt đứng tiếp xúc với nhiệt kế điện tử trên đỉnh của chip. IR LED và điốt quang được đặt sao cho chúng cắt vắn vùng tâm đường kính 1mm của một buồng.

Mặc dù được mô tả bằng cách viện dẫn đến cắt vắn của cả hai buồng với một chùm tia, có thể cắt vắn cả hai buồng sử dụng các chùm tia riêng rẽ. Một chùm tia được thể hiện chỉ nhằm mục đích minh họa.

Đầu đọc chip được gắn vào tấm nắp của hộp dự án như được mô tả trên đây sử dụng các lỗ bắt ren 150, như được thể hiện trên Hình 11.

A. Các bề mặt để hoạt hóa đông máu

Hệ vi lưu được sản xuất sao cho mẫu máu hoặc huyết tương được đưa vào tiếp xúc với bề mặt thủy tinh, phần đỉnh của chip vi lưu và/hoặc bề mặt của phần đáy của chip vi lưu, được làm từ vật liệu như là PYREX® hoặc silic được oxy hóa nhiệt, như là SiO_2 vô định hình, silic oxit, và silic nitrua. Thủy tinh dùng để hoạt hóa chuỗi yếu tố đông máu không sử dụng chất phản ứng hóa học hoặc sinh học khác. Hoạt hóa đạt được hoặc chỉ thông qua tiếp xúc mẫu với bề mặt thủy tinh hoặc thông qua chuyển dịch hoạt hóa (ví dụ, thông qua xung áp suất không khí được áp dụng từ bên ngoài) của mẫu dọc theo bề mặt thủy tinh bên trong hệ vi lưu.

Hệ vi lưu được sản xuất sao cho mẫu máu hoặc huyết tương được đưa vào tiếp xúc với bề mặt thủy tinh (hoặc bề mặt mang điện âm khác), mà dùng để hoạt hóa chuỗi yếu tố đông máu không sử dụng chất phản ứng hóa học hoặc sinh học khác. Bề mặt thủy tinh được tạo ra thông qua việc sử dụng tấm mỏng thủy tinh và tấm mỏng silic được oxy hóa, tương ứng, để tạo ra các hệ vi lưu. Tùy ý, bề mặt thủy tinh có thể được thực hiện thông qua việc sử dụng chip thủy tinh mà được tích hợp trong các phần của đầu đọc mà tạo thành hệ vi lưu, thông qua sự lắng phủ thủy tinh trên các bề mặt trong của hệ vi lưu (ví dụ, thông qua việc sử dụng sản phẩm phủ màng kiểu quay nhanh) hoặc thông qua việc tích hợp các vật thể nhỏ với bề mặt thủy tinh (ví dụ, các vi hạt thủy tinh) bên trong hệ vi lưu. Các bề mặt thủy tinh khác có thể được đưa vào bằng cách oxy hóa bề mặt silic.

B. Các đặc tính điện của màng kim loại mỏng được lắng phủ

Màng kim loại mỏng được lắng phủ có thể được hình thành từ lớp bám dính crom (dày khoảng 20nm) và lớp vàng trên mặt (dày khoảng 50nm đối với điện cực trong để đo trở kháng, dày 100nm đối với nhiệt kế điện tử và dày 150nm đối với cấu trúc bộ gia nhiệt). Chốt đứng tải lò xo trong đầu đọc bằng chất dẻo được sử dụng để thực hiện tiếp xúc điện cho tất cả điện cực màng mỏng trên chip vi lưu. Điện trở thông thường giữa hai chốt được nối vào một đầu của cấu trúc thử màng kim loại, với chiều dài bằng khoảng 2mm và chiều rộng bằng 1mm, bằng 1,8 Ôm, với chốt tiếp xúc các màng kim loại đối với cấu trúc bộ gia nhiệt, 2,7 Ôm, tiếp xúc các màng kim loại đối với nhiệt kế điện tử, và 22 Ôm, tiếp xúc các màng kim loại đối với điện cực trong để đo trở kháng. Điện trở cao hơn rõ rệt giữa các chốt điện cực trong có khả năng do lớp vàng mỏng hơn và thoái hóa tiếp xúc có thể trong quá trình liên kết anot ở khoảng 300°C. Cấu trúc bộ gia nhiệt và nhiệt kế điện tử được lắng phủ sau khi liên kết anot.

Để đo hệ số nhiệt độ của điện trở của màng kim loại mỏng được lắng phủ, chip được sử dụng mà thể hiện cấu trúc điện trở/kế điện tử thay cho điện cực mạch mở để đo trở kháng. Chip được lồng vào trong đầu đọc của nó và được gia nhiệt bên trong lò. Điện trở của bộ gia nhiệt, nhiệt kế điện tử và điện trở kế điện cực trong được đo ở các nhiệt độ khác nhau và hệ số nhiệt độ của điện trở α được tính:

- màng mỏng của bộ gia nhiệt: $\alpha = 0,0016 \text{ K}^{-1}$
- màng mỏng của nhiệt kế điện tử: $\alpha = 0,00115 \text{ K}^{-1}$
- màng mỏng của điện cực trong: $\alpha = 0,000108 \text{ K}^{-1}$.

C. Điện cực trong để định vị mẫu

Ngoài việc đo trở kháng, điện cực tích hợp còn có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của chất phân tích, như là fibrin, trong hệ vi lưu và/hoặc để theo dõi chuyển dịch của chất phân tích, ví dụ, do xung áp suất không khí được áp dụng từ bên ngoài. Việc phát hiện và theo dõi này có thể được sử dụng để bắt đầu quy trình phân tích khi chất phân tích được thêm vào hệ vi lưu, để định vị mà chất phân tích ở vị trí đặc hiệu trong hệ vi lưu, và để chuyển dịch nó lặp lại lùi và tiến giữa các vị trí được xác định, tương ứng.

Mặc dù lấy ví dụ có việ dẫn đến hai buồng và hai điện cực, nhưng nhiều điện cực có thể được sử dụng để khẳng định việc làm kín nhiều buồng, ở vị trí đo đông máu hoặc ở điểm trước khi tới buồng nơi đo đông máu, như là gần với cửa vào.

Chuyển dịch lặp lại của máu toàn phần hoặc huyết tương máu dọc theo bề mặt thủy tinh có thể được áp dụng để làm tăng sự hoạt hóa máu, để xúc tiến đông máu và/hoặc để giảm thời gian đo.

D. Tích hợp các cấu trúc bộ lọc

Cấu trúc bộ lọc cơ có thể được tích hợp vào chip vi lưu, sao cho chỉ có huyết tương máu đi đến buồng phân tích. Các bộ lọc có thể được thực hiện là mạng vi cột hoặc các vi rãnh được khắc vào trong silic hoặc thủy tinh. Theo cách này, huyết tương (không sử dụng tác nhân chống đông máu như là natri xitrat hoặc EDTA) có thể được tạo ra *tại chỗ* và được thử nghiệm rất nhanh theo cách giống như máu toàn phần, mà không gây cản trở hồng huyết cầu trong phân tích. Mạng vi cột có thể được bố trí theo mẫu bù trừ để ức chế chuyển hồng huyết cầu, trong khi giảm thiểu khả năng “tuột” phần dư của phân cắt ngang rãnh hiện có.

E. Các phương tiện để phát hiện đông máu

Các cách thức khác nhau có thể được áp dụng để xác định thời gian đông máu.

Độ nhớt

Độ nhớt của máu có thể dùng làm giá trị đo để đặc trưng thời gian đông máu. Hai nguyên lý chung có thể được áp dụng để có được đo trực tiếp hoặc gián tiếp đối với độ nhớt. Mẫu có thể được di chuyển qua rãnh với dạng hình học đã biết. Độ nhớt có thể đo được bằng cách theo dõi tốc độ thâm nhập thông qua rãnh “dài” hoặc bằng quang hóa hoặc bằng cách tạo hình ảnh hoặc “điểm kiểm tra” bằng chùm nhiều tia hoặc bằng điện bởi nhiều cảm biến trở kháng điện cực. Độ nhớt có thể đo được gián tiếp, ví dụ thông qua việc đo khoảng cách mẫu di chuyển trong rãnh trong các khoảng thời gian đặc hiệu, thể tích mẫu mà đã được đổi chỗ trong khoảng thời gian đặc hiệu, hoặc thay đổi về lực dẫn trong khoảng thời gian đặc hiệu (ví dụ, nếu mẫu được di chuyển bằng thể tích được nén của không khí bẫy được, thay đổi về áp suất không khí có thể dùng để đo gián tiếp đối với sự đổi chỗ thể tích mẫu). Tùy ý, các đối tượng có

thể được di chuyển qua mẫu máu, ví dụ, được dẫn qua lực tĩnh điện hoặc lực từ. Theo dõi di chuyển của đối tượng có thể cho phép đo gián tiếp đối với độ nhớt mẫu.

Độ nhớt của chất phân tích có thể được phát hiện thông qua chuyển dịch của chất phân tích bên trong hệ vi lưu qua thể tích không khí được bẫy, được nén. Có thể nén không khí, ví dụ, thông qua bơm khí chạy điện được kết nối với hệ vi lưu. Không khí được nén có thể được bẫy bằng việc đóng van solenoid được kết nối vào hệ vi lưu. Áp suất giảm của không khí được bẫy ở một cổng vào của chip chỉ ra sự chuyển dịch của chất phân tích. Hiểu biết về dạng hình học của hệ vi lưu và độ lớn của áp suất được áp dụng cho phép tính toán độ nhớt của chất phân tích và phát hiện thay đổi độ nhớt (ví dụ, độ nhớt tăng do đông máu trong trường hợp máu).

Phát hiện đông máu bằng cách phát hiện độ nhớt trong quá trình đo áp suất khác nhau đi qua cửa vào và cửa ra trên chip, được nối với các cổng chất lưu trên đầu đọc (làm chặt không khí/chất lưu bằng cách sử dụng nút bịt vòng chữ o).

Độ nhớt của chất phân tích có thể được phát hiện thông qua chuyển dịch của chất phân tích bên trong hệ vi lưu thông qua thể tích không khí được bẫy, được nén. Không khí có thể được nén, ví dụ, thông qua bơm khí chạy điện được nối với hệ vi lưu. Không khí được nén có thể được bẫy bằng cách đóng van solenoid được nối với hệ vi lưu. Áp suất giảm của không khí được bẫy được ở một cổng vào của chip chỉ ra chuyển dịch của chất phân tích. Hiểu biết của dạng hình học của hệ vi lưu và độ lớn của áp suất được áp dụng cho phép tính toán độ nhớt của chất phân tích và phát hiện thay đổi độ nhớt (ví dụ, độ nhớt tăng do đông máu trong trường hợp máu).

Trở kháng

Đông mẫu có thể liên quan đến trở kháng điện của nó, hoặc điện trở phức khi dòng điện hoặc điện áp được áp dụng. Trở kháng điện sinh ra từ điện trở Ohmic cũng như các thành phần điện dung của mẫu. Trở kháng điện có thể, ví dụ, được đo thông qua điện cực được tích hợp trực tiếp trong chip vi lưu hoặc được tích hợp trong đầu đọc, cùng với các phần khác, tạo thành hệ vi lưu. Điện cực có thể tiếp xúc trực tiếp một phần với mẫu hoặc được tách biệt với mẫu chỉ có bằng vật cách điện mỏng (với độ dày nằm trong khoảng từ vài nanomet lên đến vài trăm của micromet).

Điện cực và đường dẫn có thể được tạo là màng kim loại mỏng được tạo mẫu mà được lắng phủ lên trên chất nền tạo thành hệ vi lưu. Điện cực và đường dẫn còn có

thể được thực hiện thông qua việc tích hợp tấm hoặc màng kim loại được tạo mẫu được lồng vào và được kẹp giữa các phần của đầu đọc. Nếu tấm mỏng bán dẫn được sử dụng để chế tạo chip vi lưu, chính vật liệu bán dẫn có thể chứa điện cực tích hợp được tạo ra bằng cách khuếch tán, cấy, khắc, vi gia công, hoặc kết hợp bất kỳ của các kỹ thuật thích hợp tương tự với kỹ thuật được sử dụng trong sản xuất mạch tích hợp hoặc vi thiết bị khác. Điện cực tích hợp có thể được sử dụng để đo trực tiếp các đặc tính điện của chất phân tích (ví dụ, điện trở, điện dung, trở kháng). Mạch điện tử phù hợp còn có thể được sử dụng để chuyển thay đổi chất phân tích (và thay đổi liên quan về các đặc tính điện) thành điện áp đo được, dòng điện, tần số hoặc các thông số thích hợp khác. Các phần còn có thể được lồng vào trong quá trình tạo cấu trúc bằng cách in 3D, hoặc tích hợp trực tiếp. Ví dụ, yếu tố gia nhiệt của điện trở sẽ được sản xuất bằng rãnh được định mức trong chất nền bán dẫn (ví dụ, bằng cách cấy chùm tia ion).

Phát hiện đồng máu bằng cách phát hiện trở kháng được thực hiện bằng cách lồng chip vào đầu đọc, tạo tiếp xúc giữa các đệm vàng (được nối với các điện cực trên chip) và các chốt đứng trong đầu đọc mà tín hiệu điện được đọc từ đó bằng máy đo LCR, ví dụ, hoặc hệ đo thích hợp bất kỳ khác.

Để phát hiện đồng máu thông qua việc đo trở kháng, mẫu được nạp vào trong chip, chip được lồng vào trong đầu đọc của nó, và chốt đứng nối với điện cực trở kháng trong được nối nhờ kẹp Kelvin dẫn đến đến máy đo LCR QuadTech 1920. Độ lớn và pha của trở kháng phức của mẫu máu được ghi lại ở khoảng cách thời gian 15 giây. Các giá trị đo ở 100 Hz, 1kHz, 10 kHz, và 100 kHz thể hiện các đỉnh đặc trưng hoặc bình ổn độ lớn hoặc pha hoặc cả hai. Các đỉnh hoặc bình ổn chỉ ra số đo về thời gian đồng máu.

Xem trên các Hình 3A-3B, để đo trở kháng, máy đo LCR bên ngoài áp dụng điện áp AC (20 mV RMS) giữa hai điện cực 20b, 20a trên mỗi bên buồng 12a, và đo dòng điện giữa các điện cực. Độ lớn và pha của trở kháng sau đó được ước tính và đồng máu được tính.

Các đặc tính quang

Các đặc tính quang của mẫu có thể liên quan đến các sự kiện đồng máu. Ánh sáng với chiều dài bước sóng nằm trong khoảng từ 500 đến 10.000nm (tốt hơn là 1.300nm) có thể được sử dụng để chiếu sáng mẫu qua đầu đọc vi lưu và đầu đọc chip.

Các thông số dưới đây có thể được sử dụng để theo dõi đồng máu: ánh sáng được truyền, được phản xạ và được tán xạ. Nếu nguồn ánh sáng kết hợp được sử dụng, sự phân cực có thể được sử dụng làm thông số bổ sung.

Phát hiện đồng máu bởi truyền IR được tiến hành bằng cách lồng chip vào trong đầu đọc và đo sự truyền hồng ngoại ngang qua độ dày của chip (qua thủy tinh, buồng chứa chất lưu, và silic nằm dưới). Điều này được thực hiện bằng cách đặt nguồn IR (LED) trên chip và bộ phát hiện điốt quang được căn thẳng ngay bên dưới.

Để phát hiện đồng máu quang, IR LED và điốt quang được lồng vào các phần của đầu đọc của chúng như được mô tả trên đây. Mẫu máu được hút pipet vào trong chip và chip được đặt vào trong đầu đọc. Mẫu được chiếu sáng liên tục với ánh sáng IR ở 1.300nm. Ở khoảng cách thời gian thường bằng 100 ms, sụt áp qua điện trở 1 MOhm gây ra bởi dòng điện quang của điốt quang được ghi lại. Điện áp thường được đo là vài volts. Đồng mẫu làm cho ánh sáng được truyền và dòng điện quang biến thiên theo thời gian. Các đỉnh đặc trưng của đường cong ánh sáng được truyền được chỉ ra số đo về thời gian đồng máu.

Việc đo chiếu sáng liên tục được thể hiện là minh họa đơn giản. Kỹ thuật đo tinh vi hơn có thể được sử dụng. Ví dụ, nếu bộ phát IR được chiếu sáng trong 50% khoảng thời gian, ở tần suất lặp lại bằng một khz, và bộ phát hiện đồng bộ được sử dụng để xử lý tín hiệu ra của bộ phát hiện quang, tiếp theo là 1 giai đoạn tích hợp thứ cấp, tỷ lệ tín hiệu so với tiếng ồn trong ví dụ trên đây có thể được cải thiện nhiều nhất mức 30 lần. Ngoài ra, xử lý tín hiệu hoạt hóa sẽ cho phép xử lý tín hiệu nhỏ hơn nhiều, cho phép đầu kháng trở tương đối thấp của bộ phát hiện quang, hạ thấp tiếng ồn nội sinh, và xóa bỏ độ lệch. Tính nhạy tiếng ồn điện trường cơ bản được giảm.

Các đặc tính âm thanh

Đo truyền âm trong mẫu hoặc dọc theo bề mặt mẫu có thể dùng làm số đo bổ sung cho đồng máu. Bộ chuyển đổi siêu âm bên ngoài có thể được sử dụng để đo thời gian cần siêu âm để đi qua mẫu. Ngoài ra, thiết bị sóng âm bề mặt có thể được sử dụng để đo các đặc tính âm của mẫu và để phát hiện đồng máu.

III. Phương pháp tạo thiết bị

Ngoài tiêu chuẩn các quy trình tiêu chuẩn như là in ảnh litô, công nghệ đặc biệt như là liên kết anot hoặc khắc ướt không đẳng hướng kali hydroxit của tấm mỏng silic có thể được áp dụng để tạo ra vi hệ thống. Ngoài in thạch bản dùng ánh sáng tia cực tím tiêu chuẩn, các kỹ thuật như là rung hoặc mài mòn chữ laze trực tiếp, in thạch bản bằng chùm điện tử, hoặc nghiền bằng chùm ion tập trung có thể được sử dụng để xác định cấu trúc có kích thước micro hoặc nano. In thạch bản mềm là cách liên quan để chế tạo hệ vi lưu và dựa trên việc tạo ra vi cấu trúc hoặc vi mẫu, ví dụ, thông qua kỹ thuật in ảnh litô tiêu chuẩn, và sử dụng sau đó các mẫu này trong các quy trình tạo mẫu đúc/tạo khuôn. Vật liệu đàn hồi như là polydimetylsiloxan (PDMS) thường được sử dụng để tạo ra hệ vi lưu bằng cách in thạch bản mềm. Màng được cấu trúc được tạo ra bằng cách in thạch bản mềm có thể được gắn vào vào nhau hoặc vào chất nền không được cấu trúc hoặc được cấu trúc bất kỳ khác để tạo ra phức hệ vi lưu. Ngoài ra, khác công nghệ như là khoan, nghiền, đúc, hoặc in 3D, có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với khác công nghệ micro/nano để chế tạo vi hệ.

IV. Gom mẫu

Gom máu

Trong hầu hết các trường hợp, các cá nhân cần được thử nghiệm sẽ có mặt ở phòng khám hoặc bệnh viện, có thể với trạng thái chưa biết về điều trị với tác nhân chống đông máu. Máu có thể thu được bằng sử dụng bơm tiêm, kim lấy máu, hoặc trực tiếp từ đường chứa máu. Do việc sử dụng con đường đông máu khác nhau trong đó đông máu được hoạt hóa nhờ sử dụng bề mặt dạng thủy tinh, máu có thể chứa tác nhân chống đông máu như là warfarin, heparin, heparin trọng lượng phân tử thấp, các tác nhân ức chế yếu tố IIa, các tác nhân ức chế yếu tố Xa, và khác yếu tố ức chế hoặc yếu tố làm suy yếu máu.

Warfarin và phân tử chứa 4-hydroxycoumarin liên quan làm giảm đông máu bằng cách ức chế vitamin K epoxit reductaza, enzym mà phục hồi vitamin K₁ được oxy hóa thành dạng được khử của nó sau khi tham gia vào quá trình caxboxyl hóa của một số protein đông máu, chủ yếu là protrombin và yếu tố VII. Warfarin không chống lại tác động của vitamin K₁, nhưng lại chống lại sự phục hồi vitamin K₁, làm kiệt vitamin K hoạt hóa. Do đó, tác động được học có thể luôn được đảo ngược bằng vitamin K mới. Khi dùng, các thuốc này không chống đông máu ngay lập tức. Thay

vào đó, khởi phát hiệu quả của chúng cần khoảng một ngày trước khi duy trì yếu tố đông máu hoạt hóa có thời gian biến mất một cách tự nhiên trong chuyển hóa, và khoảng thời gian tác động của liều dùng warfarin đơn là từ 2 đến 5 ngày. Việc đảo ngược tác dụng của warfarin khi nó được gián đoạn hoặc vitamin K₁ được dùng, đòi hỏi thời gian tương tự.

Heparin là hợp chất xuất hiện trong gan và các mô khác mà ức chế đông máu. Polysacarit chứa lưu huỳnh, nó được sử dụng làm tác nhân chống đông máu trong điều trị huyết khối. Heparin trọng lượng phân tử thấp, sản phẩm xử lý cao hơn, là hữu dụng do nó không cần việc phát hiện bằng các thông số đông máu aPTT (nó có mức độ huyết tương dự đoán cao hơn) và có ít tác dụng phụ. Tuy nhiên, trong hình hướng chảy máu khẩn cấp khả năng để phát hiện LMWH là nhu cầu lâm sàng chưa được thỏa mãn rõ rệt vì không có thử nghiệm tại chỗ được chấp nhận về lâm sàng đối với phát hiện chống đông máu LMWH.

Các thuốc như là rivaroxaban, apixaban và edoxaban hoạt động bằng cách ức chế yếu tố Xa trực tiếp (không giống như heparin và fondaparinux, mà hoạt động nhờ hoạt hóa antitrombin).

Dạng khác của tác nhân chống đông máu là chất ức chế trombin trực tiếp. Các thành phần hiện có của nhóm này gồm có các thuốc hai tác dụng hirudin, lepirudin, và bivalirudin; và các thuốc một tác dụng argatroban và dabigatran.

Mẫu có thể được thử nghiệm là máu hoặc là huyết tương. Huyết tương có thể được chuẩn bị bằng cách lọc hoặc ly tâm. Ngoài ra, diện tích bề mặt thủy tinh bổ sung có thể được thêm vào một hoặc nhiều rãnh vi lưu bằng cách đưa các hạt thủy tinh vào trong rãnh sử dụng ví dụ chip có độ sâu gấp đôi hoặc gói hạt trong rãnh.

Các mẫu sinh học khác

Thiết bị có thể được sử dụng với các dạng mẫu khác mà được hoạt hóa bằng cách để lộ ra thủy tinh.

V. Phương pháp sử dụng

Gom mẫu và đưa vào thiết bị. Các phương tiện để xác định đông máu được khởi động khi mẫu được đặt vào trong thiết bị. Các kết quả được so sánh với các kết quả tiêu chuẩn đối với các mẫu máu không đông, thường từ vũng huyết tương hoặc

vững máu, hoặc bằng cách việc tham khảo đến thời gian đông máu khi bắt đầu của điều trị, như trong trường hợp cá nhân được dùng tác nhân chống đông máu, hoặc liệu pháp để trung hòa tác nhân chống đông máu và phục hồi lại đông máu bình thường hơn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn bằng cách việc tham khảo các ví dụ không giới hạn sau.

Ví dụ 1. Thể hiện gia nhiệt trên chip

Việc sử dụng chip để thể hiện hiệu quả của cấu trúc bộ gia nhiệt tích hợp (hoặc bộ gia nhiệt/bộ làm mát tích hợp; tốt hơn là bơm gia nhiệt trạng thái rắn hoặc “Bộ làm mát Peltier”). Áp dụng điện áp 12 V DC cho điện trở kế bộ gia nhiệt trên mặt sau của phần silic của chip vi lưu. Điện trở của nhiệt kế điện tử được đo trong mỗi buồng (bên trong nhiệt kế điện tử, trên bề mặt silic phía trước) và trên đỉnh mỗi buồng (bên ngoài nhiệt kế điện tử, trên đỉnh của PYREX®) trước khi áp dụng bộ điện áp của gia nhiệt và trong quá trình gia nhiệt. Nhiệt độ cục bộ tăng do gia nhiệt được tính toán bằng cách sử dụng điện trở đo được và hệ số nhiệt độ của điện trở như được báo cáo trước đây. Nhiệt độ phòng ở khoảng 27°C. Nhiệt độ cục bộ trung bình tăng sau khoảng 2 phút gia nhiệt không đều là:

- bên ngoài nhiệt kế điện tử: $\Delta T = 20,3 \text{ K}$
- bên trong nhiệt kế điện tử: $\Delta T = 23,8 \text{ K}$.

Ví dụ 2: Đo đông máu

Vật liệu và Phương pháp

Lấy máu từ người bệnh sử dụng thiết bị mở có trên thị trường. Thu được 10µL máu và hút pipet vào trong ống Eppendorf. Nước muối được sử dụng làm dung dịch đệm. Trộn mẫu máu trong ống Eppendorf bằng cách hút pipet lên xuống năm lần với một trong các chất phản ứng sau:

- 1µL dung dịch đệm (được gọi là đối chứng giả),
- 1µL dung dịch đệm chứa tác nhân chống đông máu edoxaban ở nồng độ bằng 300 ng/mL,

- 1 μ L dung dịch đậm chứa tác nhân chống đông máu edoxaban và tác nhân đảo ngược chống đông máu PER977, cả hai ở nồng độ bằng 300 ng/mL.

Edoxaban là thuốc chống đông máu có trên thị trường. PER977 (ciraparantag) là thuốc điều tra mà được thiết kế để đảo ngược tác dụng của edoxaban. Ngay sau khi trộn, 2,5 μ L mỗi mẫu máu được hút pipet vào trong thiết bị chip đóng. Chip được lồng vào trong đầu đọc của nó, và cả giá trị đo ánh sáng IR và trở kháng được ghi lại ngay lập tức ở nhiệt độ phòng (khoảng 27°C). Bỏ qua gia nhiệt mẫu máu.

Các kết quả thu được bằng cả cách IR và trở kháng của độ nhớt.

Các kết quả

Như thể hiện từ các Hình 12A-12F, IR (các Hình 12B, 12D, và 12F) và các giá trị đo trở kháng (12A, 12C, và 12E) tương quan rất tốt với nhau. Cả hai giá trị đo thể hiện cho đối chứng giả một đỉnh đặc trưng ở khoảng 2 phút là chỉ báo của thời gian đông mẫu. Việc bổ sung tác nhân chống đông máu edoxaban làm dịch chuyển đỉnh này đến khoảng 4 phút. Ngoài đỉnh này, đường cong edoxaban thể hiện tối thiểu cục bộ đặc trưng ở khoảng 12 phút. Việc bổ sung tác nhân đảo ngược chống đông máu PER977 vào mẫu máu chứa edoxaban làm dịch chuyển đỉnh trong mỗi đường cong mặt lùi lại 2 phút và chặn sự xuất hiện của tối thiểu cục bộ ở khoảng 12 phút. Các giá trị đo này chỉ ra hiệu quả làm chậm đông máu của edoxaban và việc đảo ngược hiệu quả này bằng việc dùng thêm PER977.

Các dạng biến đổi và cải biến của thiết bị, hệ thống và phương pháp sử dụng của chúng sẽ là hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực từ phần mô tả chi tiết trên đây và được hiểu là bao gồm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thiết bị vi thử nghiệm để đo sự đông máu trong mẫu máu hoặc mẫu huyết tương từ một cá thể, thiết bị này bao gồm

vi chip thử nghiệm, vi chip thử nghiệm này bao gồm

đầu vào cho mẫu máu hoặc mẫu huyết tương, đầu vào này truyền thông với một hoặc nhiều vi kênh có độ dài nằm trong khoảng từ hàng micromét đến hàng milimét,

mỗi vi kênh gồm một hoặc nhiều buồng thử nghiệm, mỗi vi kênh có thể tích xác định nằm trong khoảng từ hàng nanolit đến hàng mililít,

mỗi một hoặc nhiều vi kênh gồm ít nhất một bề mặt tích điện anion hoạt hóa sự đông máu của mẫu máu hoặc mẫu huyết tương khi mẫu máu hoặc mẫu huyết tương đi vào một hoặc nhiều vi kênh hoặc buồng thử nghiệm, trong đó bề mặt tích điện anion không bao gồm các hóa chất hoạt hóa sự đông máu và

buồng thử nghiệm được tạo thành từ vật liệu cho phép sự thay đổi độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học trong máu hoặc huyết tương trong buồng thử nghiệm,

trong đó vi chip thử nghiệm được cài vào đầu đọc, đầu đọc này bao gồm

đầu dò xác định các thay đổi về độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học trong mẫu máu hoặc mẫu huyết tương trong buồng thử nghiệm để đo thời gian đông máu, và

yếu tố kiểm soát nhiệt độ điều chỉnh nhiệt độ của buồng thử nghiệm,

trong đó đầu dò được tạo cấu hình để xuất thời gian đông máu đo được được xác định từ thời điểm hoạt hóa mẫu đến thời gian thay đổi độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học trong buồng thử nghiệm chỉ ra sự đông máu.

2. Thiết bị theo điểm 1, trong đó đầu ra từ đầu đọc truyền thông với bộ giám sát hoặc màn hiển thị hoặc lưu trữ thông tin.

3. Thiết bị vi thử nghiệm theo điểm 1, trong đó đầu đọc bao gồm bộ gia nhiệt tích hợp để kiểm soát nhiệt độ của buồng thử nghiệm trong vi chip thử nghiệm đã cài.

4. Thiết bị vi thử nghiệm theo điểm 1 bao gồm các giao diện điện, quang hoặc lỏng với vi chip thử nghiệm.

5. Thiết bị vi thử nghiệm theo điểm 1 bao gồm nguồn hồng ngoại và đầu dò hồng ngoại, được bố trí để phát hiện sự thay đổi độ nhớt trong buồng thử nghiệm của vi chip thử nghiệm đã cài.

6. Thiết bị vi thử nghiệm theo điểm 1, trong đó sự đông máu được đo bằng đầu đọc từ các thay đổi qua buồng thử nghiệm của vi chip thử nghiệm bởi các thay đổi về điện trở.

7. Thiết bị vi thử nghiệm theo điểm 1, trong đó sự đông máu được đo bằng đầu đọc sử dụng bộ chuyển đổi âm thanh.

8. Phương pháp để đo thời gian đông máu bao gồm bước đưa mẫu máu hoặc huyết tương vào

vi chip thử nghiệm được cài vào đầu đọc để đo sự đông máu trong mẫu máu hoặc mẫu huyết tương,

vi chip thử nghiệm này bao gồm

đầu vào cho mẫu máu hoặc mẫu huyết tương, đầu vào thông với một hoặc nhiều vi kênh có độ dài nằm trong khoảng từ hàng micromét đến hàng milimét, mỗi vi kênh bao gồm một hoặc nhiều buồng thử nghiệm, mỗi vi kênh có thể tích xác định nằm trong khoảng từ hàng nanolít đến hàng mililít,

mỗi một hoặc nhiều vi kênh bao gồm ít nhất một bề mặt tích điện anion hoạt hóa sự đông máu của mẫu máu hoặc mẫu huyết tương khi mẫu máu hoặc mẫu huyết tương đi vào một hoặc nhiều vi kênh hoặc buồng thử nghiệm trong đó bề mặt tích điện anion không bao gồm các hóa chất hoạt hóa sự đông máu,

trong đó buồng thử nghiệm được tạo thành từ vật liệu cho phép sự thay đổi độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học trong mẫu máu hoặc mẫu huyết tương được đo trong buồng thử nghiệm, và

đầu đọc bao gồm

đầu dò xác định các thay đổi về độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học trong mẫu máu hoặc mẫu huyết tương trong buồng thử nghiệm để đo thời gian đông máu, và

yếu tố kiểm soát nhiệt độ điều chỉnh nhiệt độ của buồng thử nghiệm,

trong đó đầu dò được tạo cấu hình để xuất thời gian đông máu đo được được xác định từ thời điểm hoạt hóa mẫu máu hoặc mẫu huyết tương đến thời gian thay đổi

độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học trong buồng thử nghiệm chỉ ra sự đông máu.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó mẫu là từ người có máu không đông.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó kiểu không đông là chưa biết.

11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó máu được làm cho không đông bằng chất chống đông mà tác động lên máu để thời gian đông máu không thể được đo bằng thời gian Thromboplastin một phần được hoạt hóa (activated Partial Thromboplastin Time - aPTT).

12. Phương pháp theo điểm 8 bao gồm bước ghi lại thời gian đông máu.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó việc chuyển qua mẫu được đo từ thời gian xác định đến thời gian đông máu đỉnh.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó việc đo được thực hiện với ánh sáng có bước sóng nằm trong khoảng từ 1150 đến 1700 nm.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó việc đo được thực hiện với ánh sáng có bước sóng bằng 1300 nm.

16. Phương pháp theo điểm 12, trong đó yếu tố kiểm soát nhiệt độ làm nóng mẫu đến nhiệt độ cơ thể để đo thời gian đông máu.

17. Vi chip thử nghiệm để đo thời gian đông máu trong mẫu máu hoặc mẫu huyết tương, vi chip thử nghiệm này bao gồm

đầu vào cho mẫu máu hoặc mẫu huyết tương, đầu vào này truyền thông với một hoặc nhiều vi kênh có độ dài nằm trong khoảng từ hàng micromét đến hàng milimét,

mỗi vi kênh gồm một hoặc nhiều buồng thử nghiệm, mỗi vi kênh có thể tích xác định nằm trong khoảng từ hàng nanolit đến hàng mililit và được tạo cấu hình để hút mẫu máu hoặc mẫu huyết tương vào một hoặc nhiều buồng thử nghiệm này nhờ tác dụng mao dẫn thụ động,

mỗi một hoặc nhiều vi kênh gồm ít nhất một bề mặt tích điện anion tại đầu vào đi vào vi kênh và/hoặc đi vào buồng thử nghiệm hoạt hóa sự đông máu của mẫu máu hoặc mẫu huyết tương khi đi vào mẫu máu hoặc mẫu huyết tương đi vào một hoặc nhiều vi kênh hoặc buồng thử nghiệm,

trong đó bề mặt tích điện anion không bao gồm các hóa chất hoạt hóa sự đông máu, và

trong đó các thay đổi độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học chỉ ra sự tạo thành cục đông có thể được đo trong buồng thử nghiệm.

18. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17 trong đó buồng thử nghiệm được tạo thành từ vật liệu cho phép sự thay đổi độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học trong máu hoặc huyết tương trong buồng thử nghiệm.

19. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17, còn bao gồm yếu tố kiểm soát nhiệt độ.

20. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17, còn bao gồm bộ phận điện để chuyển kết quả về sự thay đổi độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học, đến đầu đọc hoặc bộ giám sát bên ngoài.

21. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17 được chế tạo thông qua khắc ướt không đẳng hướng tấm mỏng silic và sau đó oxy hóa bằng nhiệt, khắc ướt đẳng hướng tấm mỏng thủy tinh bosilicat giãn nở nhiệt thấp, trong, sự lắng đọng phủ màng kim loại mỏng trên tấm mỏng thông qua khuôn tô, liên kết anốt của silic và tấm mỏng thủy tinh bosilicat giãn nở nhiệt thấp, trong, hoặc germani hoặc gali và sau đó tách các chip đơn bằng cách vạch ô tấm mỏng.

22. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17, trong đó vi chip này còn bao gồm IR LED hoặc điốt quang để đo các thay đổi quang học.

23. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17 bao gồm điện cực và đường dây dẫn được thực hiện thông qua sự tích hợp các tấm kim loại được tạo mẫu hoặc màng mỏng.

24. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17 bao gồm vật liệu bán dẫn, trong đó vật liệu bán dẫn này có thể đóng vai trò làm điện cực, và có thể được sử dụng để đo trực tiếp các đặc tính điện của chất phân tích như điện trở, điện dung, và kháng trở.

25. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17 bao gồm chất nền bán dẫn pha tạp được chế tạo thành yếu tố gia nhiệt điện trở.

26. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17, trong đó vi chip thử nghiệm bao gồm vi kênh đơn để đo sự đông máu.

27. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17, trong đó bề mặt tích điện là thủy tinh và/hoặc silic được oxy hóa.

28. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17, trong đó mỗi một hoặc nhiều buồng thử nghiệm có thể tích nằm trong khoảng từ 1 đến 10 microlít.

29. Vi chip thử nghiệm theo điểm 17, trong đó vi chip thử nghiệm được sử dụng một lần.

30. Phương pháp đo thời gian đông máu, phương pháp này bao gồm các bước:

đặt mẫu máu hoặc mẫu huyết tương lên vi chip thử nghiệm theo điểm 17 trong đầu đọc để đo sự đông máu trong mẫu máu hoặc mẫu huyết tương,

trong đó đầu đọc bao gồm

đầu dò xác định các thay đổi về độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học trong mẫu máu hoặc mẫu huyết tương trong buồng thử nghiệm để đo thời gian đông máu, và

yếu tố kiểm soát nhiệt độ điều chỉnh nhiệt độ của buồng thử nghiệm,

trong đó đầu dò được tạo cấu hình để xuất thời gian đông máu đo được được xác định từ thời điểm hoạt hóa mẫu máu hoặc mẫu huyết tương đến thời điểm thay đổi độ nhớt, kháng trở, đặc tính âm thanh, hoặc đặc tính quang học trong buồng thử nghiệm chỉ ra sự đông máu, và

thu được kết quả đầu ra của thời gian đông máu.

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó mẫu lấy từ người có máu không đông.

32. Phương pháp theo điểm 31, trong đó kiểu không đông là chưa biết.

33. Phương pháp theo điểm 30, trong đó máu được làm không đông bằng chất chống đông mà tác động lên máu để thời gian đông máu không thể đo được bằng thời gian Thromboplastin một phần được hoạt hóa (activated Partial Thromboplastin Time - aPTT).

Ba con đường tạo ra con đường đông máu cổ điển

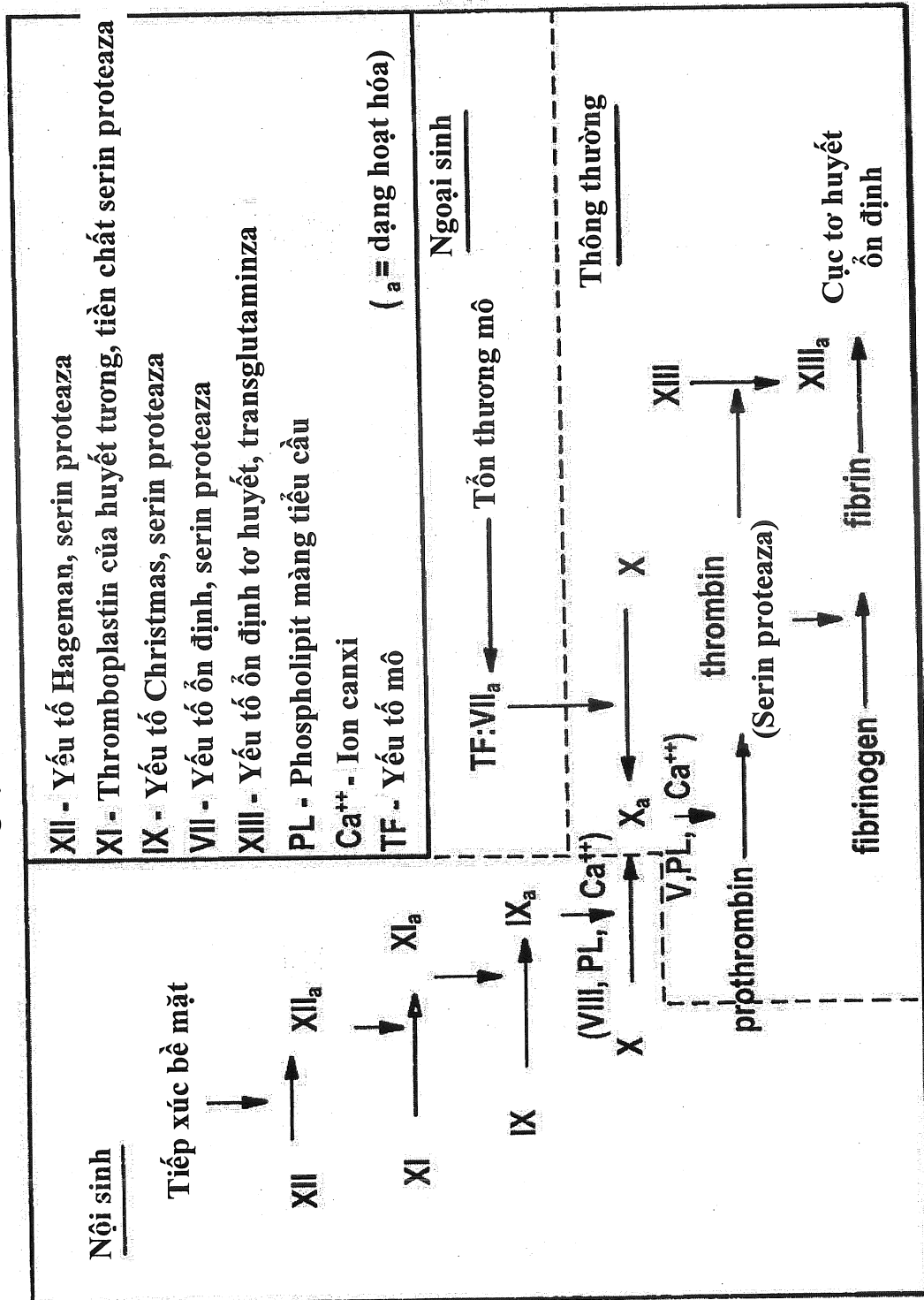


FIG. 1

2/14

Phiên bản đóng

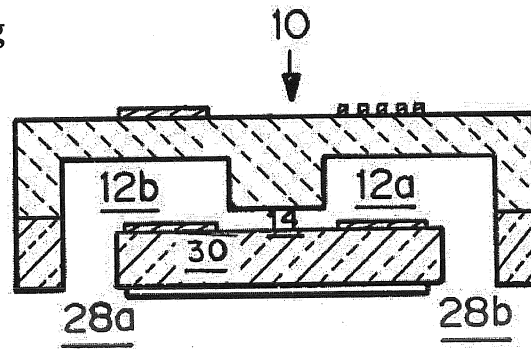


FIG. 2A

Phiên bản mở

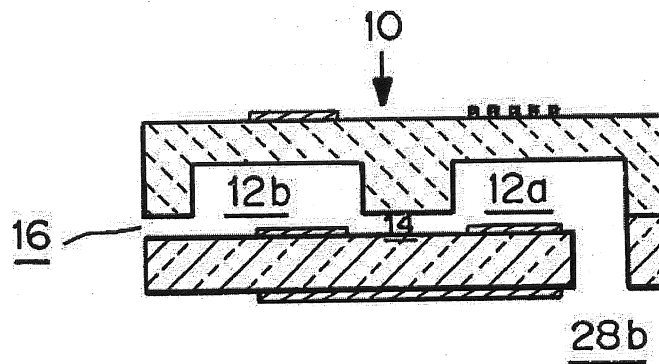


FIG. 2B

3/14

Phiên bản đóng

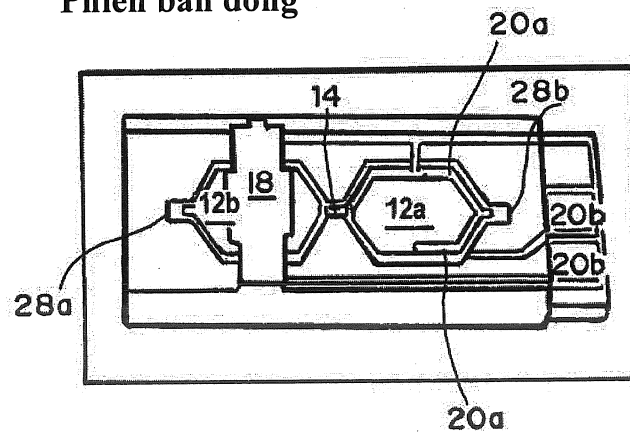


FIG. 3B

Phiên bản mở

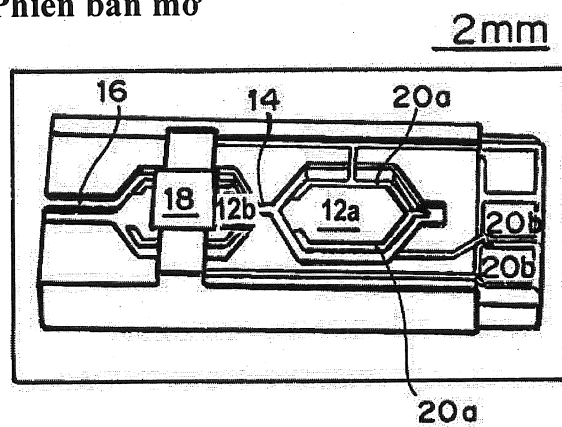


FIG. 3A

4/14

Phiên bản đóng

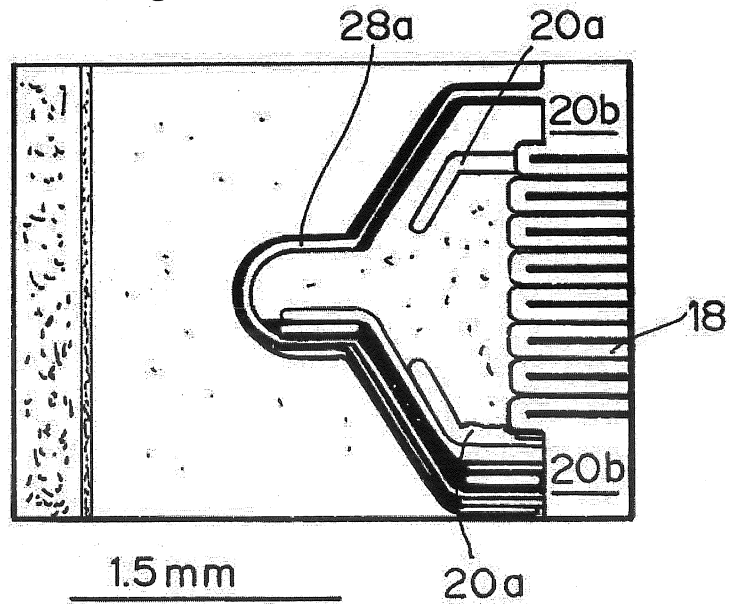


FIG. 4B

Phiên bản mở

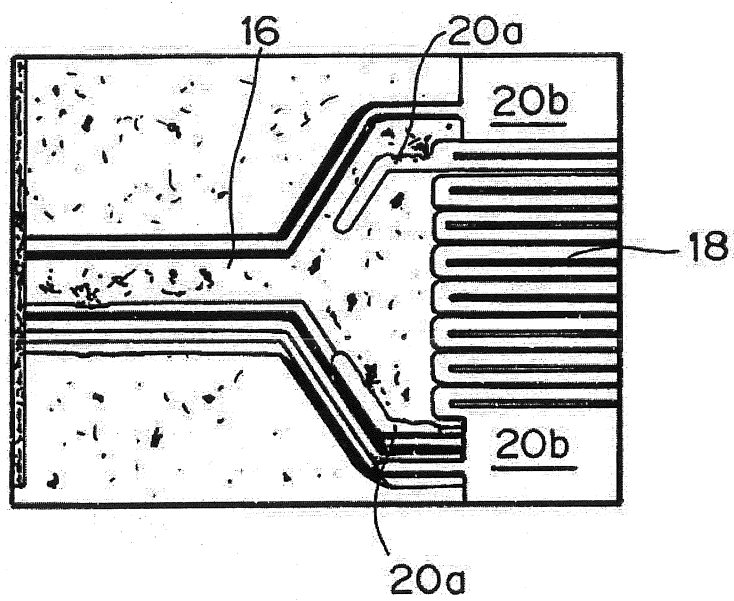


FIG. 4A

5/14

Đóng mặt trước

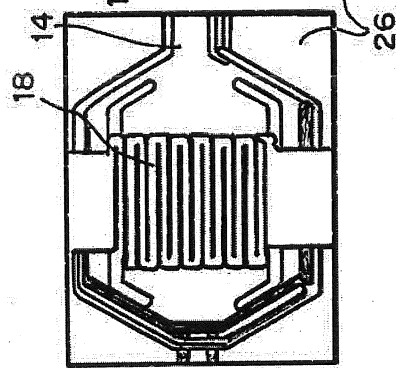


FIG. 4C

Đóng mặt sau

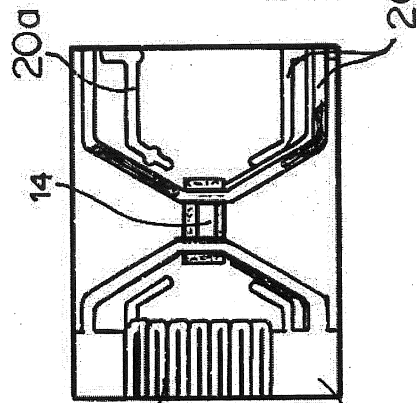


FIG. 4D

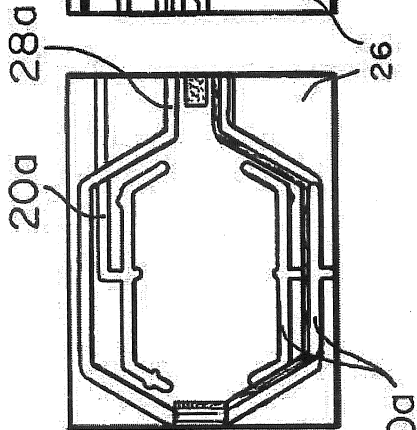


FIG. 4E

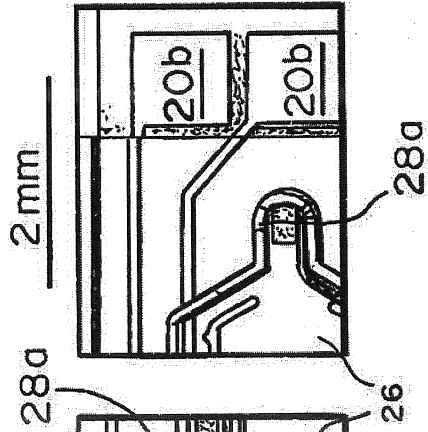


FIG. 4F

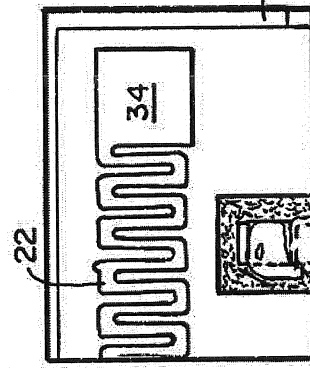


FIG. 4G

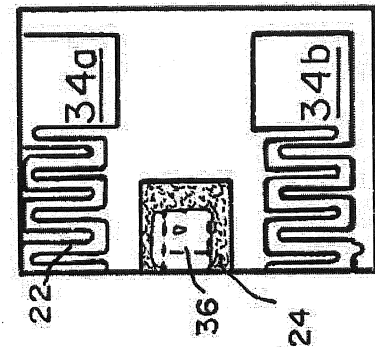
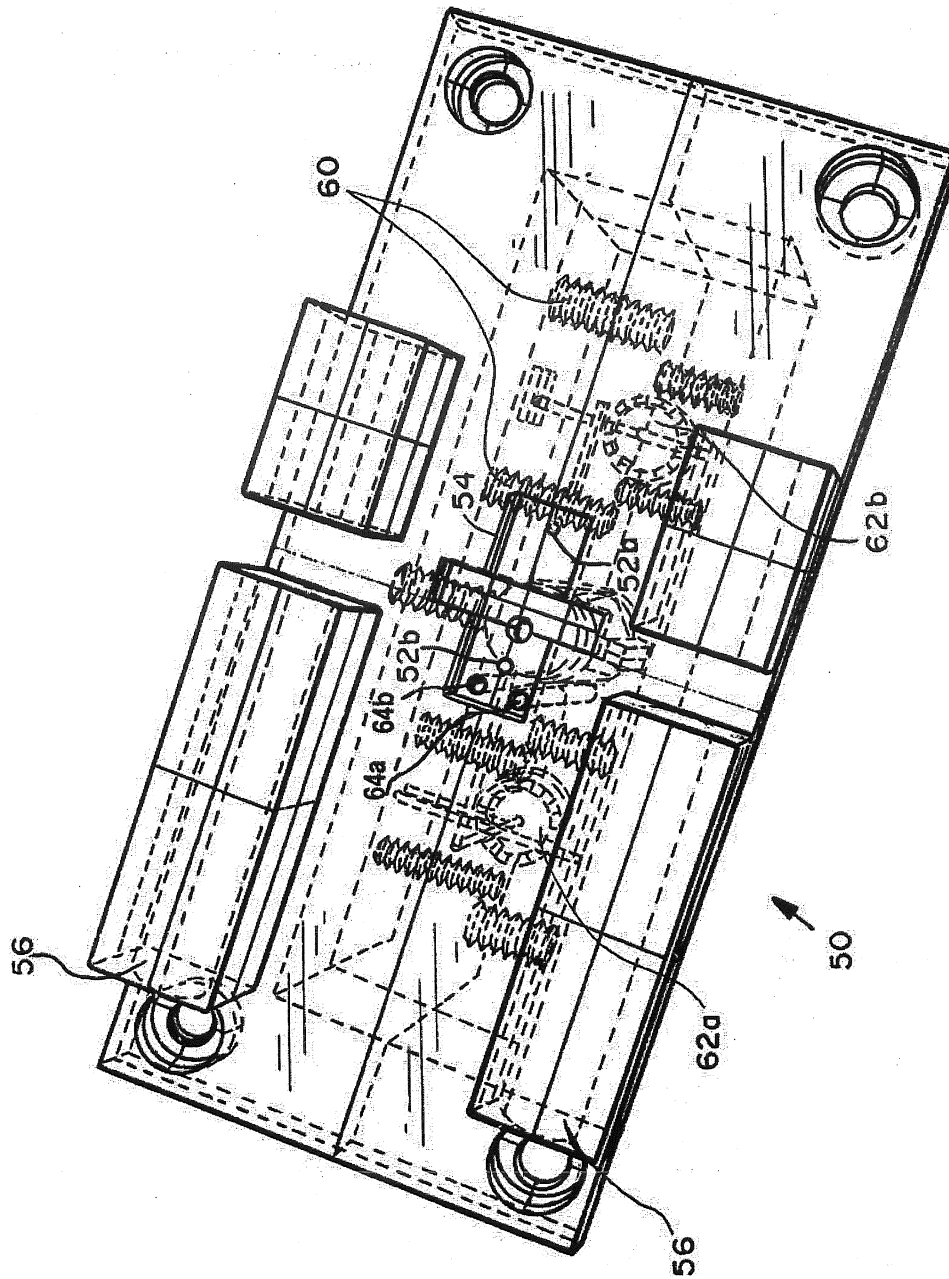


FIG. 4H

6/14

FIG. 5

Phần lắp ráp ở đáy, phiên bản đóng



Phần lắp ráp ở đáy, phiên bản đóng (hình khác)

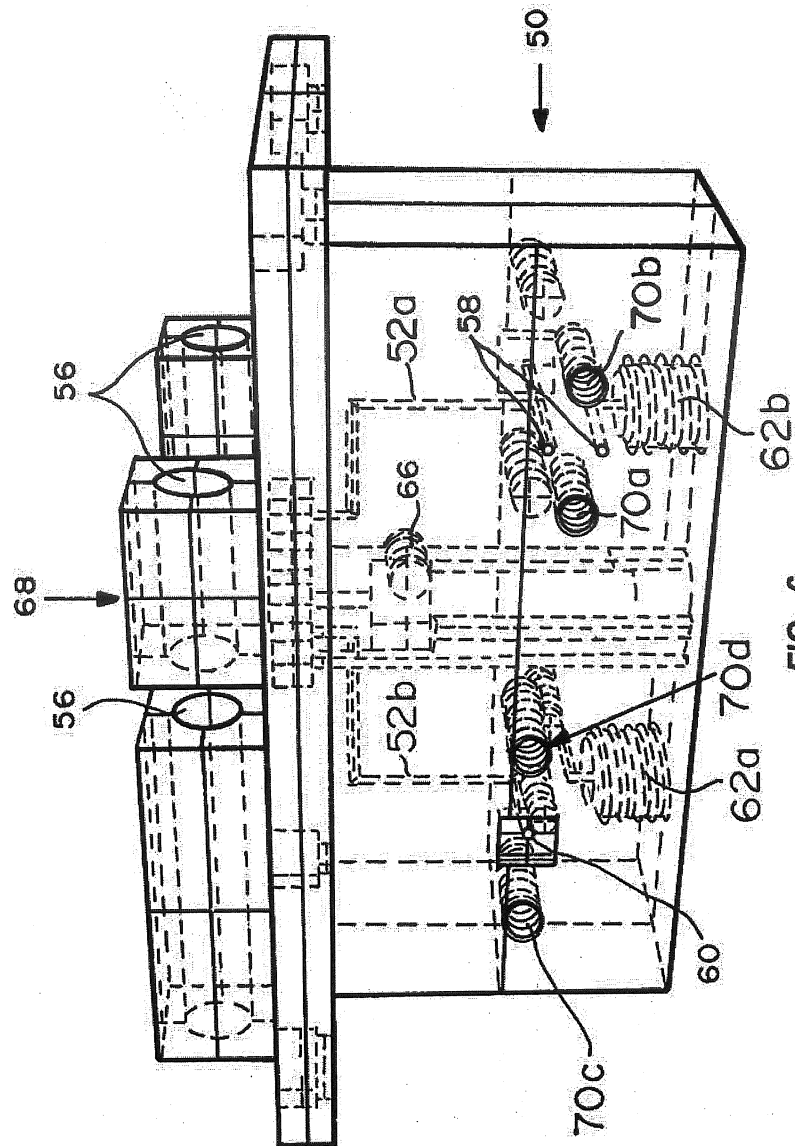
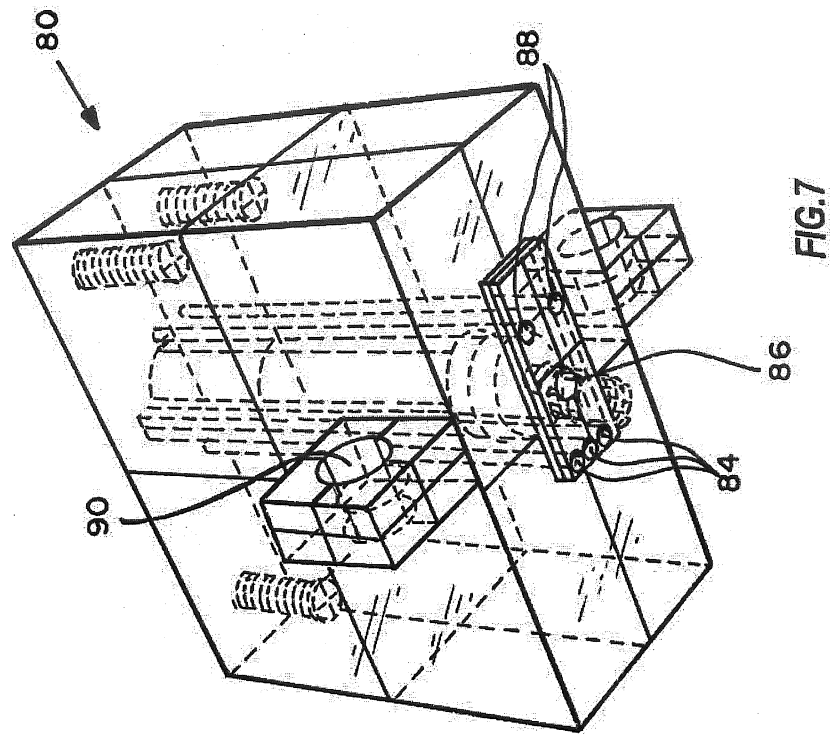


FIG. 6

Phần đỉnh, phiên bản đóng



9/14

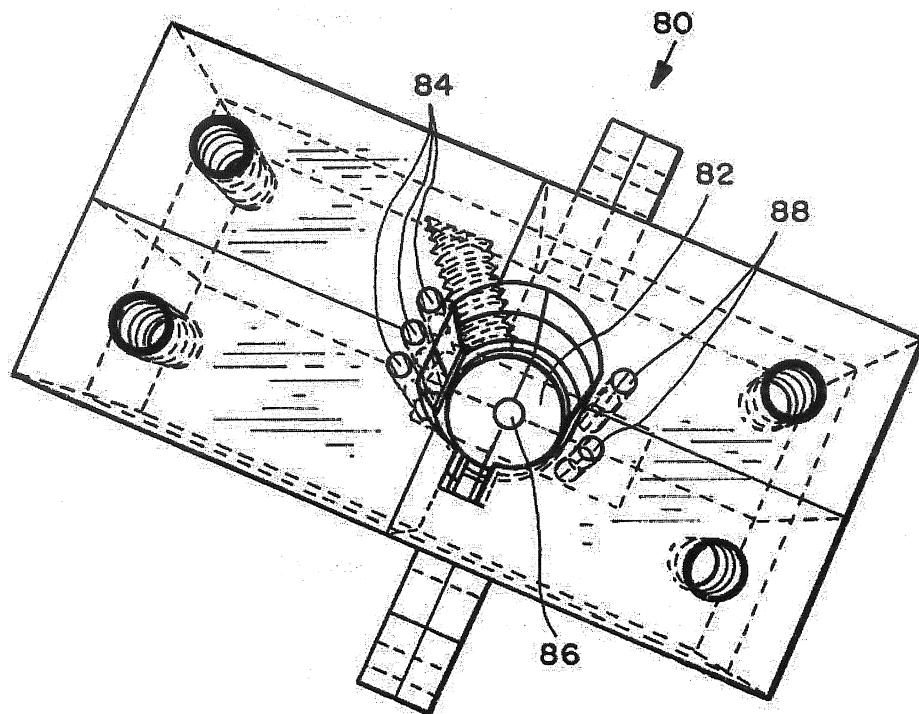


FIG. 8

Phần đáy, phiên bản mở

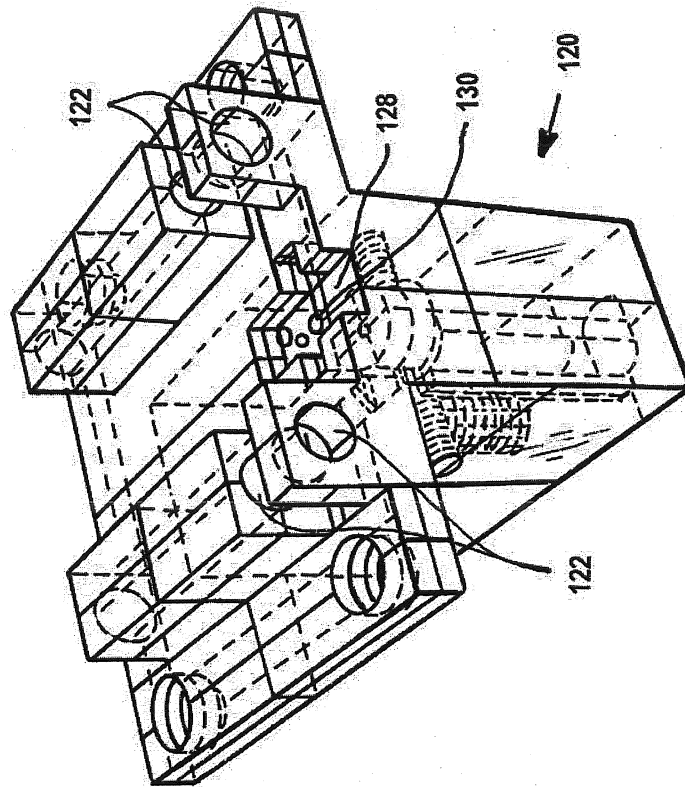


FIG. 9A

Hình khác

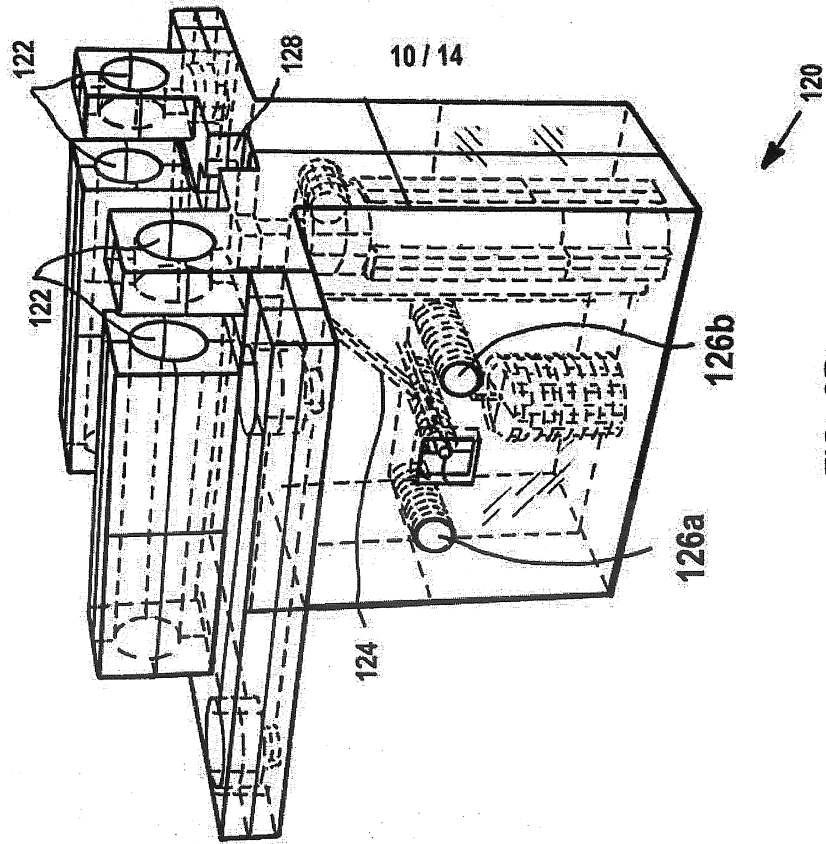


FIG. 9B

11 / 14

Hình khác

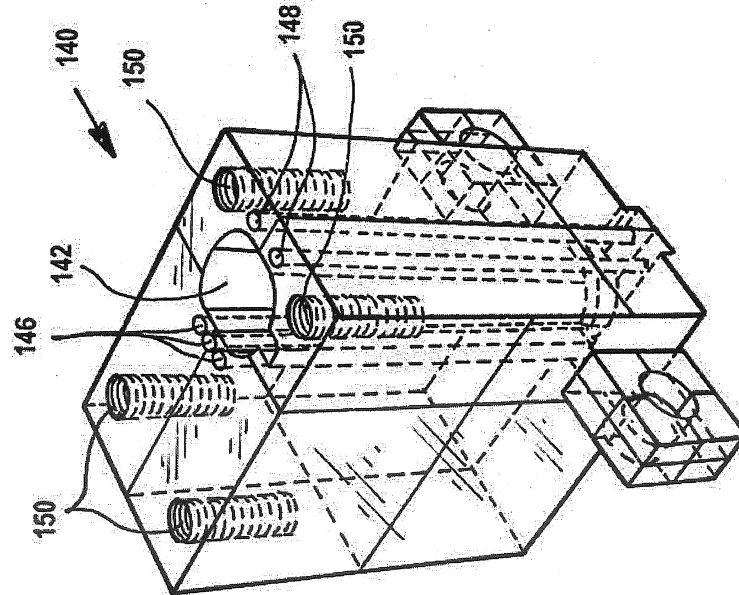
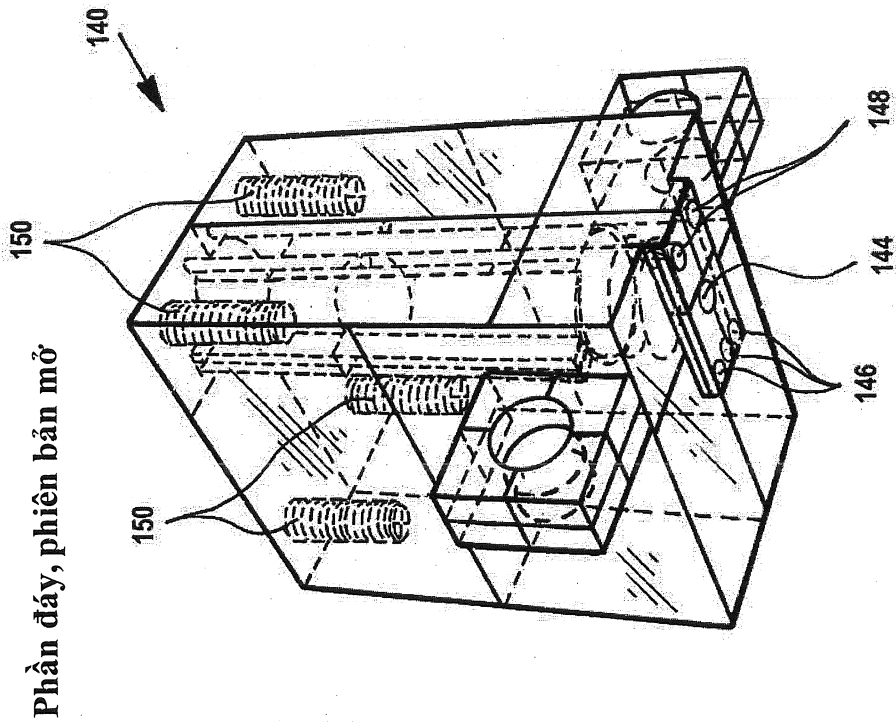
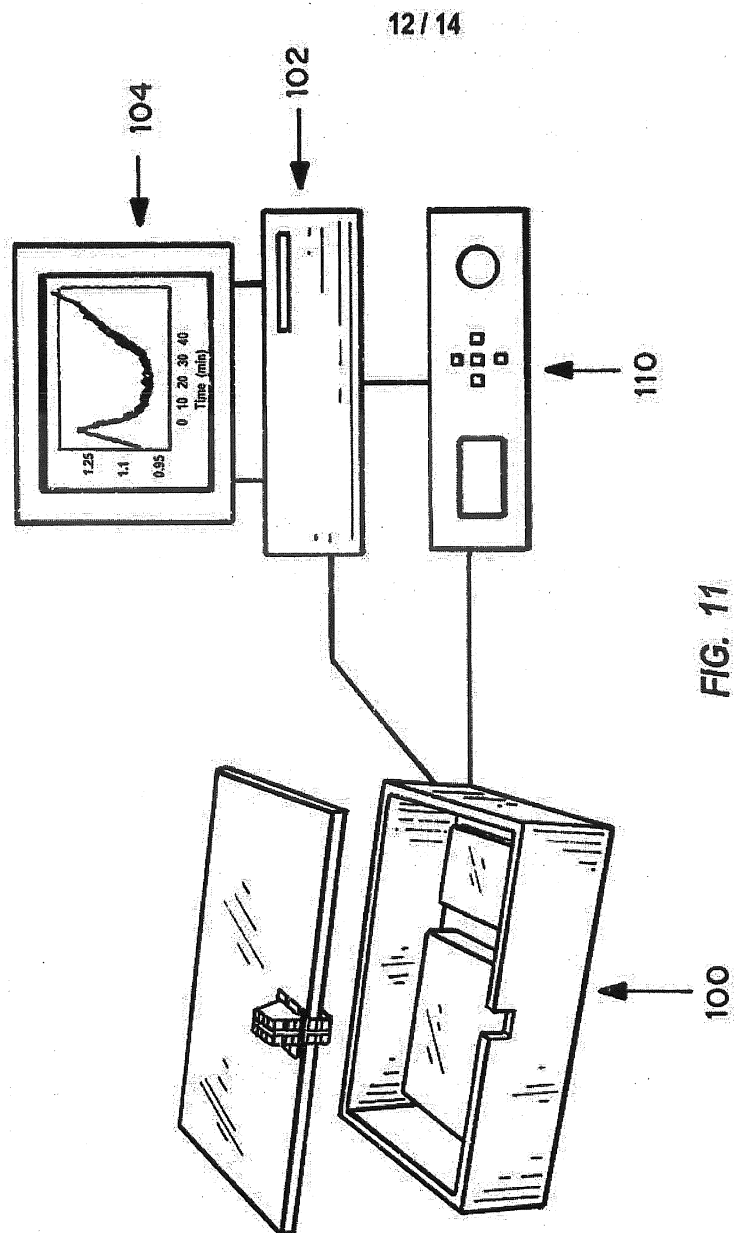


FIG. 10B



Phần đáy, phiên bản mở

FIG. 10A



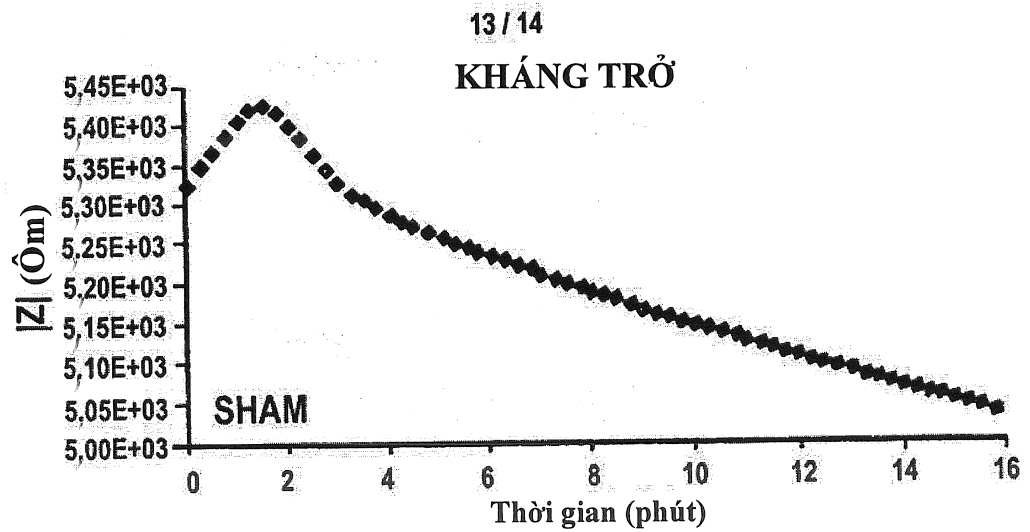


FIG. 12A

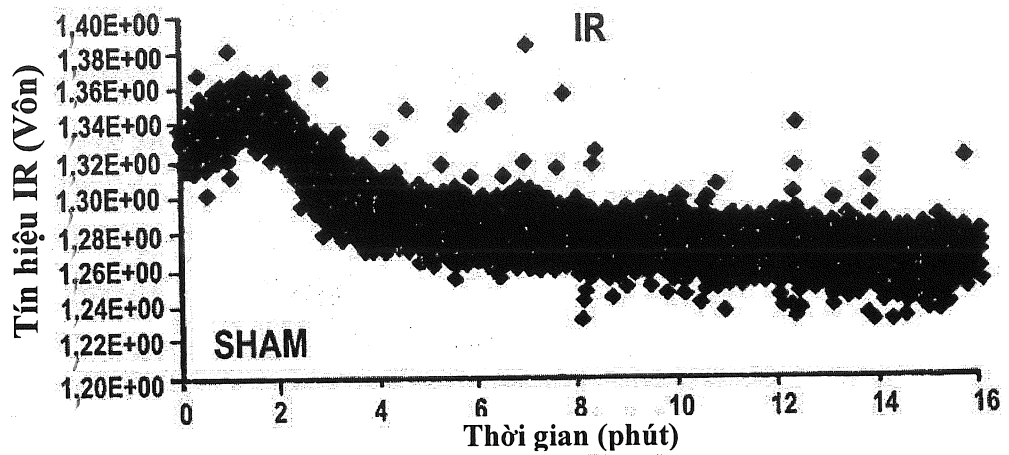


FIG. 12B

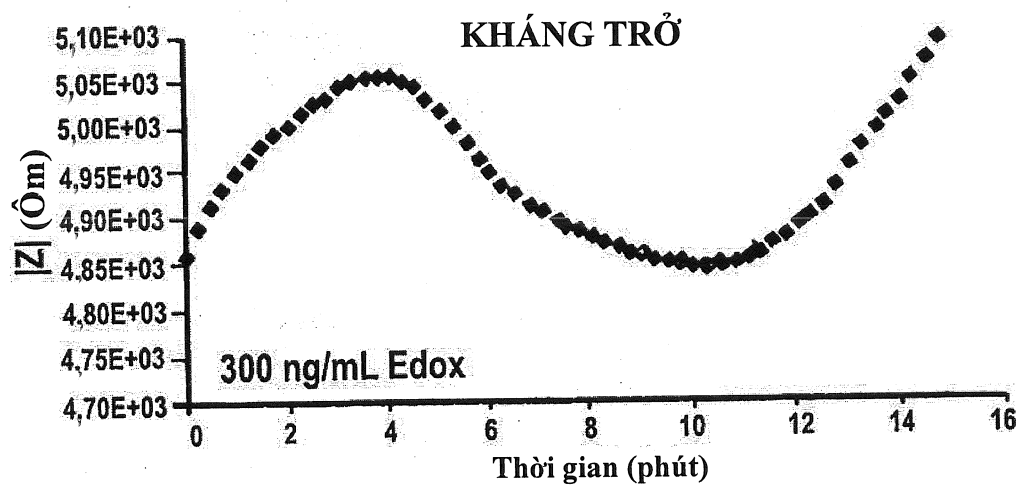


FIG. 12C

