



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003408

(51) **G01N 33/00; C12Q 1/00; G01N 27/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00200

(22) 13/05/2020

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/08/2020 389

(73) **VŨ QUANG KHUÊ (VN)**

Số Nhà 18, Khu Bò Sơn, Võ Cường, Thành phố Bắc Ninh, Tỉnh Bắc Ninh

(72) **Vũ Quang Khuê (VN); Trần Quang Huy (VN); Lê Anh Tuấn (VN); Vũ Ngọc Phan (VN); Nguyễn Khắc Từ (VN).**

(54) **QUY TRÌNH CHẾ TẠO CẢM BIẾN SINH HỌC ĐIỆN HÓA**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến “Quy trình chế tạo cảm biến sinh học điện hóa” trong đó cảm biến được chế tạo bằng việc sử dụng điện cực in lưới các bon làm nền trên cơ sở biến tính hạt nano vàng để cố định kháng thể vi khuẩn *MRSA* kết hợp với thiết bị điện hóa được chế tạo theo nguyên lý đo điện áp. Giải pháp hữu ích này có ưu điểm ở chỗ phát hiện trực tiếp vi khuẩn *MRSA* nhanh trong 30 phút, đo phát hiện vi khuẩn lưu động tại thực địa có ứng dụng ý nghĩa trong việc kiểm soát nhiễm trùng bệnh viện.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến cảm biến sinh học điện hóa và thiết bị điện hóa cầm tay để ứng dụng phát hiện nhanh vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện tại thực địa. Thiết bị cảm biến sinh học điện hóa khả năng phát hiện vi khuẩn tụ cầu vàng kháng methicillin (*MRSA* - Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) ở dải đo từ 10^1 CFU/ml đến 10^6 CFU/ml, thời gian đo nhanh từ 30 phút, bộ cảm biến và thiết bị cho độ chọn lọc cao nhất với vi khuẩn *MRSA*.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Không chế và ngăn chặn kịp thời các tác nhân gây nhiễm trùng bệnh viện là một trong các nhiệm vụ ưu tiên hàng đầu của các cơ sở khám chữa bệnh. Vấn đề này đang được cả thế giới quan tâm do ngày càng xuất hiện nhiều chủng vi khuẩn kháng kháng sinh, thậm chí kháng đa thuốc. Nhiễm trùng bệnh viện là một trong những thách thức to lớn và mối quan tâm hàng đầu ở Việt Nam và các nước đang phát triển. Hàng năm, Hoa Kỳ có 1,7 triệu người nhiễm trùng bệnh viện và có tới 99 nghìn người tử vong. Vi khuẩn tụ cầu vàng kháng methicillin (*MRSA* -Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) chỉ chịu được một số kháng sinh nhất định, *MRSA* lây lan qua tiếp xúc gần gũi với da của người bị nhiễm khuẩn hoặc do dùng chung vật dụng cá nhân đã tiếp xúc với da bị nhiễm khuẩn. Các vật dùng chung có thể làm lây lan tụ cầu khuẩn bao gồm khăn tắm, xà phòng, băng vết thương, băng cuộn... và các dụng cụ và thiết bị y tế, dịch và mủ của vết thương rất dễ gây nhiễm khuẩn. Chính vì khả năng lây lan lớn lên vi khuẩn *MRSA* được coi là một trong những tác nhân có khả năng gây nhiễm trùng bệnh viện có nguy cơ cao.

Các phương pháp phân tích sinh học truyền thống đang được sử dụng để chẩn đoán có kết quả phân tích chính xác và rất tin cậy. Tuy nhiên, những phương pháp này (PCR-Polemerase Chain Reaction, ELISA- Enzyme-linked Immunosorbent assay) là những phương pháp phân tích phức tạp đòi hỏi kỹ thuật viên có tay nghề cao, các trang thiết bị và phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn và được đặt ở các trung tâm phân tích, nghiên cứu tập trung. Yêu cầu các sinh phẩm và hóa chất đặc hiệu khi thực hiện quá trình phân tích. Cảm biến sinh học điện hóa là một trong những phương pháp mới với mục đích nhằm dần bổ sung hoặc thay thế để khắc phục các nhược điểm của phương pháp truyền

thống. Ưu điểm của thiết bị này là nhỏ gọn, có thời gian phân tích nhanh, độ nhạy cao, chi phí thấp và đặc biệt là khả năng lưu động của bộ thiết bị cảm biến.

Các nghiên cứu được công bố gần đây chủ yếu tập trung nghiên cứu độc lập về cảm biến sinh học điện hóa, các quá trình phát hiện phải lấy mẫu trở lại phòng thí nghiệm mới có thiết bị đo và phân tích, chưa có sự kết hợp cảm biến và thiết bị để tạo thành 01 bộ tích hợp để có thể khảo sát, phát hiện vi khuẩn nhanh ngay tại thực địa.

Vì vậy, trong giải pháp hữu ích này chúng tôi đề xuất chế tạo thiết bị, cảm biến sinh học điện hóa trên cơ sở biến tính hạt nano vàng để phát hiện nhanh vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện ở nồng độ giới hạn thấp nhất, thời gian đáp ứng nhanh kết hợp đồng bộ giữa cảm biến điện hóa và thiết bị điện hóa để tạo thành 01 bộ tích hợp phát hiện nhanh vi khuẩn *MRSA* ngay tại thực địa.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất việc chế tạo cảm biến sinh học điện hóa và thiết bị trên cơ sở sử dụng điện cực in lưới (SPE - Screen Printing Electrode) thương mại các bon biến tính với vật liệu hạt nano vàng (AuNPs - Gold Nano Particles). Hạt nano vàng có kích thước trung bình ~ 20 nm được biến tính điện cực làm việc (WE -Working Electrode) sau đó cố định kháng thể vi khuẩn *MRSA* bằng phương pháp liên kết cộng hóa trị. Cảm biến sinh học điện hóa được chế tạo dựa trên nguyên lý đo điện áp trong kỹ thuật điện hóa, kết hợp để xử lý tín hiệu ra từ cảm biến sinh học điện hóa và hiển thị kết quả đo phát hiện vi khuẩn *MRSA* của cảm biến trên màn hình tinh thể lỏng (LCD -Liquid Crystal Display). Nguyên lý và cấu trúc của cảm biến sinh học điện hóa dựa trên cơ sở điện cực in lưới các bon, biến tính bằng hạt nano vàng trên điện cực làm việc. Điện cực biến tính được cố định kháng thể thông qua nhóm chức bằng phương pháp liên kết cộng hóa trị, kháng thể được ủ trên bề mặt và liên kết với nhóm chức của điện cực biến tính trước khi được khóa đặc hiệu bằng albumin huyết thanh bò (BSA- Bovine serum albumin), sau đó được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong môi trường ẩm chứa muối photphat. Thiết bị điện hóa được thiết kế chế tạo dựa trên nguyên lý đo điện áp bao gồm các khối: khối nguồn, khối phát hiện tín hiệu since, khối tách sóng biên độ, khối xử lý trung tâm và khối hiển thị.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 minh họa phương pháp chế tạo cảm biến sinh học điện hóa được đề xuất trong giải pháp hữu ích này.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình chế tạo cảm biến sinh học điện hóa được thực hiện như sau:

Bước 1: sử dụng điện cực in lưới các bon làm đế nền;

Bước 2: biến tính bề mặt điện cực của điện cực in lưới các bon với hạt nano vàng bằng cách: rót 25 ml dung dịch nano vàng nồng độ 100 ppm cho vào ống ly tâm 1,5 ml và rung lắc trong 3 phút, sau đó ly tâm trong 5 phút ở tốc độ quay 5.000 vòng/phút để loại bỏ tạp chất, tiếp tục ly tâm 5 phút ở tốc độ 15.000 vòng/phút thu được dung dịch đồng nhất; sử dụng pipet để nhỏ phủ dung dịch thu được lên bề mặt điện cực làm việc của điện cực in lưới các bon, để khô tự nhiên 30 phút trước khi sử dụng;

Bước 3: tạo nhóm thiol trên bề mặt điện cực bằng cách ủ điện cực đã được phủ nano vàng thu được ở bước 2 với dung dịch MTS (Mercaptopropyl-trimethoxysilane) 2% trong toluen trong thời gian 60 phút, sau đó rửa điện cực trong toluen và làm khô bằng khí N₂, tiếp tục ủ 30 phút với hỗn hợp dung dịch 12,5 mg GMBS (Gamma-Maleimido Butyryloxy Succinimide) trong 250 μ L DMSO (Dimethyl Sulfoxide) và 43 mL EtOH (Ethanol);

Bước 4: ủ kháng thể lên điện cực thu được ở bước 3 trong 60 phút tại nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C ở nồng độ 10 μ g/mL kháng thể *MRSA* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) trong dung dịch đệm PBS pH 7,4;

Bước 5: thu được cảm biến bằng cách rửa 3 lần điện cực thu được ở bước 4 bằng dung dịch muối đệm PBS 0,05 M, tiếp tục ủ với dung dịch BSA (Bovine serum albumin) nồng độ 0,1 M trong 30 phút để khóa những vị trí gắn kết không đặc hiệu và lưu trữ cảm biến ở 4°C;

Bước 6: đóng gói thiết bị tích hợp cảm biến đo lưu động bằng bản mạch được thiết kế chế tạo 02 lớp kích thước bản mạch dài 150 mm x rộng 70 mm;

Như được thể hiện trên Hình 1, các bước thực hiện quy trình được minh họa như sau:

bước 1A minh họa điện cực làm việc của điện cực in lưới các bon;

bước 1B minh họa bước biến tính điện cực làm việc bằng hạt nano vàng;

bước 1C minh họa bước ủ hóa chất GMBS (Gamma-Maleimido Butyryloxy Succinimide) tạo nhóm chức -NHS (N-Hydroxy Succinimide) trong 60 phút;

bước 1D minh họa bước ủ kháng thể vi khuẩn *MRSA* trong 30 phút;

bước 1E minh họa bước phủ BSA để khóa những vị trí không đặc hiệu bảo quản trong 4°C;

bước 1F minh họa bước ủ vi khuẩn *MRSA* để đo đặc trưng của cảm biến;

Hiệu quả kỹ thuật đạt được

Đây là một giải pháp hữu ích liên quan trực tiếp đến việc đo phát hiện nhanh vi khuẩn *MRSA*, loại vi khuẩn phổ biến gây nhiễm trùng bệnh viện ảnh hưởng đến sức khỏe con người và thiệt hại kinh tế, đời sống xã hội. Bộ thiết bị cảm biến sinh học điện hóa cho phép phát hiện vi khuẩn ở dải đo rộng từ 10^1 CFU/ml đến 10^6 CFU/ml, giới hạn phát hiện thấp $LoD = 15$ CFU/ml, thời gian phát hiện từ 30 phút. Bộ thiết bị cảm biến sinh học điện hóa được ứng dụng trong kỹ thuật y tế dự phòng và trong công nghệ thực phẩm, thiết bị cảm biến sinh học điện hóa theo giải pháp hữu ích có ưu điểm là:

Cảm biến sinh học điện hóa có thời gian đáp ứng nhanh, giới hạn phát hiện thấp so với cảm biến công bố của nhóm tác giả Ravalli và cộng sự công bố trên tạp chí “Sensors and Actuators, B”, 2013

Thiết bị điện hóa theo giải pháp hữu ích cho phép sử dụng cầm tay, lưu động có thể đo đặc ở xa trung tâm có ý nghĩa trong việc phát hiện sớm vi khuẩn tại thực địa để khoanh vùng, dập dịch trước khi có các kết quả phân tích với thời gian (4giờ-8giờ) từ phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy thiết bị cảm biến điện hóa sử dụng sự linh hoạt, dễ dàng (không đòi hỏi kỹ thuật viên có tay nghề cao), ngôn ngữ sử dụng tiếng việt, dễ thay thế, sửa chữa, giá thành thấp so với các sản phẩm thương mại nhập ngoại như trạm phân tích điện hóa METROHM, Palmsen (Hà Lan).

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình chế tạo cảm biến sinh học điện hóa bao gồm các bước:

bước 1: sử dụng điện cực in lưới các bon làm đế nền;

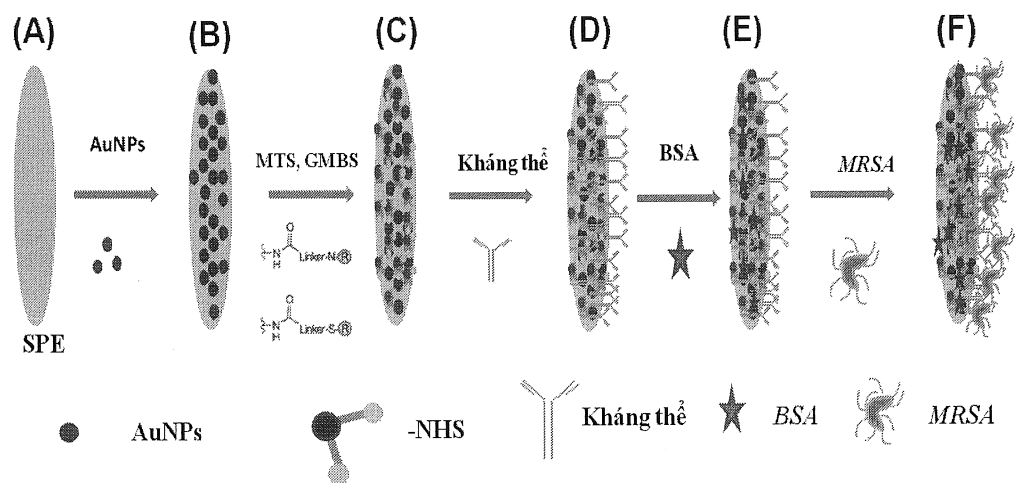
bước 2: biến tính bề mặt điện cực làm việc của điện cực in lưới các bon với hạt nano vàng bằng cách: rót 25 ml dung dịch nano vàng nồng độ 100 ppm cho vào ống ly tâm 1,5 ml và rung lắc trong 3 phút, sau đó ly tâm trong 5 phút ở tốc độ quay 5.000 vòng/phút để loại bỏ tạp chất, tiếp tục ly tâm 5 phút ở tốc độ 15.000 vòng/phút thu được dung dịch đồng nhất; sử dụng pipet để nhỏ phủ dung dịch thu được lên bề mặt điện cực làm việc của điện cực in lưới các bon, để khô tự nhiên 30 phút trước khi sử dụng;

bước 3: tạo nhóm thiol trên bề mặt điện cực bằng cách ủ điện cực đã được phủ nano vàng thu được ở bước 2 với dung dịch MTS (Mercaptopropyl-Trimethoxysilane) 2% trong toluen trong thời gian 60 phút, sau đó rửa điện cực trong toluen và làm khô bằng khí N₂, tiếp tục ủ 30 phút với hỗn hợp dung dịch 12,5 mg GMBS (Gamma-Maleimido Butyryloxy Succinimide) trong 250 μ L DMSO (Dimethyl Sulfoxide) và 43 mL EtOH (Ethanol);

bước 4: ủ kháng thể lên điện cực thu được ở bước 3 trong 60 phút tại nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C ở nồng độ 10 μ g/mL kháng thể *MRSA* (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) trong dung dịch đệm PBS pH 7,4;

bước 5: thu được cảm biến bằng cách rửa 3 lần điện cực thu được ở bước 4 bằng dung dịch muối đệm PBS 0,05 M, tiếp tục ủ với dung dịch BSA (Bovine serum albumin) nồng độ 0,1 M trong 30 phút để khóa những vị trí gắn kết không đặc hiệu và lưu trữ cảm biến ở 4°C;

bước 6: đóng gói thiết bị tích hợp cảm biến đo lưu động bằng bản mạch được thiết kế chế tạo 02 lớp, kích thước bản mạch dài 150 mm x rộng 70 mm.



Hình 1