



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

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

(11)



1-0039120

(51)<sup>2020.01</sup> G01N 33/558; G01N 33/569

(13) B

(21) 1-2020-03619

(22) 15/05/2018

(86) PCT/EP2018/062466 15/05/2018

(87) WO2019/101370 31/05/2019

(30) 17203120.5 22/11/2017 EP

(45) 25/03/2024 432

(43) 25/11/2021 404

(73) Dewact Labs GmbH (DE)

Holtzendorfstrasse 13, 14057 Berlin-Charlottenburg, Germany

(72) JAKSCHIES, Detlef (DE).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP VÀ DỤNG CỤ ĐỂ PHÂN BIỆT NHIỄM VIRUT VÀ NHIỄM KHUẨN

(57) Sáng chế đề cập đến dụng cụ và phương pháp thử nghiệm tại chỗ để phát hiện và phân biệt nhiễm virut và nhiễm khuẩn, giúp hỗ trợ hiệu quả trong việc phân biệt nhanh nhiễm virut và nhiễm khuẩn. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến thử nghiệm miễn dịch mà phân biệt nhanh chóng giữa nhiễm virut và/hoặc nhiễm khuẩn, trong đó chất đánh dấu virut là protein Mx-B cảm ứng interferon và các chất đánh dấu vi khuẩn là CRP/PCT/BPI.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực thử nghiệm tại chỗ (POC) để phân biệt nhiễm virus và nhiễm khuẩn. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến thử nghiệm miễn dịch giúp phân biệt nhanh chóng giữa nhiễm virus và/hoặc nhiễm khuẩn.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Sốt là nguyên nhân phổ biến khiến trẻ nhỏ phải đi khám ở các trung tâm chăm sóc khẩn cấp đối với cả phòng khám gia đình và phòng khám nhi khoa. Thông thường nhất là do các nguyên nhân liên quan đến nhiễm trùng đường hô hấp hoặc viêm dạ dày ruột. Tỷ lệ mắc sốt cao ở trẻ em và việc sử dụng dự phòng các thuốc kháng sinh không cần thiết là lý do để phát triển loại xét nghiệm sàng lọc nhanh chóng cho các chất đánh dấu sinh học chỉ ra sự nhiễm virus và/hoặc nhiễm khuẩn.

Khoảng 60% các trường hợp viêm phổi nghiêm trọng mắc phải trong cộng đồng là do nhiễm khuẩn, trong đó yêu cầu nhập viện để chăm sóc tích cực (ICU) là khoảng 10% bệnh nhân. 40% còn lại có liên quan đến các virus đường hô hấp. Hầu hết nhiễm trùng đường hô hấp liên quan đến viêm họng, trong đó 40% gây ra bởi virus và 25-50% gây ra bởi liên cầu khuẩn tan huyết beta nhóm A. Nguyên nhân do liên cầu khuẩn tan huyết beta nhóm A là viêm phế quản cấp và viêm phổi.

Khoảng 80% các chất kháng vi sinh vật được kê trong chăm sóc ban đầu, và lên đến 80% trong số này là dùng cho các chỉ định đường hô hấp. Cho đến nay, nhiễm trùng đường hô hấp là nguyên nhân gây ho phổ biến nhất trong chăm sóc ban đầu. Các kháng sinh phổ rộng thường được kê cho bệnh ho, bao gồm viêm phế quản cấp, và nhiều trong số các đơn thuốc này sẽ chỉ có lợi ích rất nhỏ cho bệnh nhân, và có thể gây ra tác dụng phụ và có thể thúc đẩy hiện tượng kháng thuốc kháng sinh. Các yếu tố thúc đẩy các bác sĩ điều trị cho dùng thuốc kháng sinh bao gồm việc không có chất đánh dấu giúp chẩn đoán đầy đủ về việc nhiễm khuẩn, các mối lo ngại về việc thiếu sự theo dõi bệnh nhân và áp lực thời gian.

Vẫn còn nhiều thách thức trong việc phân biệt nhanh nhiễm virus với nhiễm khuẩn. Gần đây, nhiều chất đánh dấu giúp chẩn đoán mới đã được nhận biết. Một vài

trong số các chất đánh dấu này cho thấy triển vọng lớn trong việc phân biệt nhiễm virus với nhiễm khuẩn. Các protein như vậy bao gồm các Mx-GTPaza và protein phản ứng C (CRP).

Các protein tương đồng Mx là thành viên của siêu họ GTPaza có phân tử lượng lớn. Theo đó, các GTPaza này được điều hòa tăng bởi các interferon (IFN) typ I alpha/beta hoặc typ II. Các Mx GTPaza này được biểu hiện chỉ trong các tế bào được xử lý IFN alpha/beta mà không phải là IFN gamma. Các interferon typ I đóng vai trò quan trọng trong các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và có các chức năng điều biến miễn dịch, chống tăng sinh và kháng virus.

Các nghiên cứu riêng đã chỉ ra rằng các protein tương đồng Mx của người có các lợi thế sau đây: 1) Các protein tương đồng Mx của người được biểu hiện chủ yếu ở nội bào. Chúng có thể được nhìn thấy bằng cách nhuộm nội bào trong hầu hết các ngăn tế bào [16]. 2) Các protein tương đồng Mx được cảm ứng theo cách phụ thuộc vào liều [6]. 3) Các protein tương đồng Mx của người được cảm ứng đặc hiệu bởi các interferon typ I, không phải bởi IFN-gamma, IL-1, TNF-alpha, hoặc bất kỳ xytokin khác bởi nhiễm khuẩn [8,12]. 4) Các protein tương đồng Mx của người có thể phát hiện lâu hơn nhiều so với interferon typ I trong hệ máu ngoại vi [6]. Do đó, các protein này là chất đánh dấu để nhận diện các bệnh do virus [7,14,15]. Hơn nữa, các protein này có thể được sử dụng làm chất đánh dấu để nhận diện các bệnh nhân được điều trị bằng interferon typ I nếu phương pháp điều trị bởi IFN này thành công hay không thành công [5,9,10,11]. Trong các nghiên cứu ban đầu, các tác giả sáng chế phát hiện ra các protein này bằng phân tích thấm tách Western sau khi dùng SDS-PAGE.<sup>12</sup> Nhưng phương pháp này cần hơn hai ngày. Vì vậy, các tác giả sáng chế đã thiết lập ELISA để phát hiện các protein này trong vòng hai ngày [13].

Dựa vào thực tế nêu trên và giả thiết rằng interferon typ I vẫn ở mức bình thường trên các bệnh nhân mắc nhiễm khuẩn, sự biểu hiện protein tương đồng Mx trong máu ngoại vi là chất đánh dấu nhạy và đặc hiệu đối với sự nhiễm virus.

Tương tự, hầu hết các ca nhiễm virus được báo cáo là gây ra nồng độ đáp ứng pha cấp tính nhỏ và nồng độ protein phản ứng C (CRP) thấp, mức procaxitonin (PCT) thấp và protein tăng tính diệt khuẩn/tính thấm (BPI) thấp. Do đó, các protein này sẽ được sử dụng để phân biệt các bệnh có nguồn gốc từ virus với các bệnh do vi

khuẩn. Do nồng độ CRP trong huyết tương tăng nhanh sau khi kích thích và giảm nhanh với chu kỳ bán rã ngắn, CRP có thể là công cụ rất hữu ích trong chẩn đoán và theo dõi các nhiễm trùng và các bệnh viêm. Ở Scandinavia, xét nghiệm CRP tại chỗ là một phần của việc đánh giá hàng ngày cho các bệnh nhân mắc nhiễm trùng đường hô hấp trong thực tế nói chung và việc sử dụng chúng được chứng minh có hiệu quả về chi phí. Trong thực tế nói chung, CRP được thấy là có giá trị trong việc chẩn đoán các bệnh do vi khuẩn và trong việc phân biệt một phần nhiễm khuẩn và nhiễm virus. Thông thường giá trị chẩn đoán của CRP được thấy là vượt trội so với giá trị chẩn đoán của tốc độ lắng hồng cầu (ESR) và vượt trội hoặc bằng với giá trị chẩn đoán của số lượng tế bào bạch cầu (WBC). Nhược điểm của việc xét nghiệm tại chỗ này là thời gian phát hiện lâu. Các xét nghiệm này cần tối thiểu 30 phút đến 2 giờ.

Về mặt lâm sàng, có thể khó để phân biệt nhiễm virus và nhiễm vi khuẩn toàn thân nhất định. Việc nuôi cấy vi khuẩn thường được thực hiện trong các trường hợp nhiễm trùng nặng như viêm phổi hoặc khi hậu quả của việc thiếu chẩn đoán có thể dẫn đến các biến chứng nghiêm trọng, chẳng hạn như với viêm họng do liên cầu khuẩn. Thông thường, việc nuôi cấy khó có thể đạt được. Không may là, việc nuôi cấy virus không được thực hiện thường xuyên do sự chậm trễ đáng kể về thời gian trong việc thu nhận kết quả. Các tấm PCR sàng lọc virus mới rất hữu ích, nhưng chúng đắt và không cung cấp thông tin tại chỗ, do kết quả chỉ có thể có được sau 24 giờ. Do đó, vẫn cần một xét nghiệm chẩn đoán đơn giản, dễ sử dụng mà có khả năng phân biệt được nhiễm virus và nhiễm khuẩn trong thời gian ngắn.

WO2010/033963 bộc lộ bộ thử nghiệm miễn dịch dòng bên để phát hiện và phân biệt nhiễm virus và nhiễm khuẩn. Chất đánh dấu vi khuẩn là CRP và chất đánh dấu virus là protein Mx-A. Bộ thử nghiệm này được bán trên thị trường Châu Âu với tên thương mại là FebriDx®. Tuy nhiên, theo nghiên cứu, FebriDx® chỉ có độ chính xác nhận diện nhiễm khuẩn và nhiễm virus lần lượt là 63% và 84%. Do đó, vẫn cần bộ thử nghiệm chẩn đoán tại chỗ nhanh chóng để phân biệt nhiễm khuẩn và nhiễm virus ở bệnh nhân chính xác và đáng tin cậy hơn.

#### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là đề xuất thử nghiệm chẩn đoán cải tiến, đặc hiệu và chính xác hơn để phân biệt nhiễm khuẩn và nhiễm virus ở bệnh nhân một cách đáng tin

cây trong thời gian ngắn. Mục đích này được giải quyết bởi đối tượng của sáng chế.

Theo sáng chế, sáng chế đề xuất dụng cụ thử nghiệm miễn dịch tại chỗ (POC) bao gồm:

- a. vùng đặt mẫu, và
- b. vùng phát hiện với thuốc thử phát hiện thứ nhất có ái lực liên kết với protein Mx-B (Mx-B), và thuốc thử phát hiện thứ hai có ái lực liên kết với protein phản ứng C (CRP/PCT), và

trong đó dụng cụ có cấu tạo để phát hiện Mx-B và CRP/PCT trong mẫu từ đối tượng để phân biệt giữa nhiễm khuẩn và nhiễm virus.

Theo một phương án khác của sáng chế, sáng chế đề xuất dụng cụ thử nghiệm miễn dịch tại chỗ (POC) bao gồm:

- a. vùng đặt mẫu, và
- b. vùng phát hiện với thuốc thử phát hiện thứ nhất có ái lực liên kết với protein Mx-B (Mx-B), và thuốc thử phát hiện thứ hai có ái lực liên kết với protein phản ứng C (CRP), và thuốc thử phát hiện thứ ba có ái lực liên kết với procaxitonin (PCT) và/hoặc thuốc thử phát hiện thứ tư có ái lực liên kết với protein tăng tính diệt khuẩn/tính thấm BPI, và

trong đó dụng cụ có cấu tạo để phát hiện Mx-B và CRP/PCT trong mẫu từ đối tượng để phân biệt giữa nhiễm khuẩn và nhiễm virus.

Một phương án của sáng chế đề cập đến dụng cụ như được mô tả ở đây, còn bao gồm thuốc thử phát hiện thứ ba có ái lực liên kết với BPI.

Một phương án của sáng chế đề cập đến dụng cụ như được mô tả ở đây, trong đó các thuốc thử phát hiện đã nêu được chọn từ các phân tử tổng hợp, các nucleotit, các axit nucleic, các aptame, các peptit, các protein, các enzym và các kháng thể.

Một phương án của sáng chế đề cập đến dụng cụ như được mô tả ở đây, trong đó các thuốc thử phát hiện đã nêu được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến dụng cụ như được mô tả ở đây, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện được chọn từ nhãn enzym, nhãn huỳnh quang,

nhãn phóng xạ, nhãn hạt, hạt latec màu, hạt nhựa màu, hạt photpho màu và hạt huỳnh quang.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến dụng cụ như được mô tả ở đây, còn bao gồm cửa sổ xét nghiệm có cấu tạo để cho phép quan sát các kết quả xét nghiệm.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến dụng cụ như được mô tả ở đây, trong đó các thuốc thử phát hiện được liên hợp hóa học với chất đánh dấu có thể phát hiện để tạo thành phức hợp thuốc thử-chất đánh dấu cố định, không thuận nghịch.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến dụng cụ như được mô tả ở đây, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện được liên hợp với thuốc thử phát hiện có cấu tạo để có thể nhìn thấy bởi người dùng khi mẫu dương tính đối với Mx-B và/hoặc CRP và/hoặc PCT và/hoặc BPI.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến dụng cụ như được mô tả ở đây, trong đó dụng cụ được tạo cấu hình thành/hoặc PCT và/hoặc BPI trong các mẫu máu của người.

Một phương án của sáng chế đề cập đến phương pháp phân biệt giữa nhiễm khuẩn và nhiễm virus ở đối tượng, bao gồm các bước:

- a. cung cấp mẫu từ đối tượng đã nêu,
- b. cung cấp hệ thống xét nghiệm như được mô tả ở đây,
- c. đưa mẫu vào hệ thống xét nghiệm,
- d. quan sát sự không có mặt hoặc có mặt của phức hợp thuốc thử có thể phát hiện-chất đánh dấu để xác định xem mẫu có chứa Mx-B và/hoặc CRP và/hoặc PCT và/hoặc BPI hay không, và
- e. xác định tình trạng nhiễm trùng của bệnh nhân.

Một phương án của sáng chế đề cập đến phương pháp như được mô tả ở đây, trong đó

- a. sự có mặt của Mx-B và sự không có mặt và/hoặc sự phát hiện thấp của CRP/PCT/BPI chỉ ra sự nhiễm virus,

b. sự không có mặt của Mx-B và sự có mặt của CRP/PCT/BPI chỉ ra sự nhiễm khuẩn; và

c. sự có mặt của Mx-B và sự có mặt của CRP/PCT/BPI chỉ ra sự nhiễm trùng hỗn hợp.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến phương pháp như được mô tả ở đây, còn bao gồm bước quan sát sự không có mặt hoặc có mặt của phức hợp thuốc thử có thể phát hiện-chất đánh dấu để xác định xem liệu mẫu có chứa CRP/PCT/BPI hay không.

Một phương án của sáng chế đề cập đến phương pháp như được mô tả ở đây, trong đó

a. sự có mặt của Mx-B và sự không có mặt của CRP/PCT và BPI chỉ ra sự nhiễm virus,

b. sự không có mặt của Mx-B và sự có mặt của CRP/PCT và BPI chỉ ra sự nhiễm khuẩn; và

c. sự có mặt của Mx-B và sự có mặt của CRP/PCT và BPI chỉ ra sự nhiễm trùng hỗn hợp.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến phương pháp như được mô tả ở đây, trong đó mẫu là mẫu máu.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến phương pháp như được mô tả ở đây, trong đó sự có mặt của Mx-B, CRP/PCT và/hoặc BPI có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1A mô tả xét nghiệm lấy làm ví dụ được thiết lập gồm ba băng thử được phủ các kháng thể đã được đánh dấu.

Fig.1B mô tả các ảnh xét nghiệm khác nhau đối với sự nhiễm virus, nhiễm khuẩn, nhiễm trùng hỗn hợp hoặc nhiễm trùng không chắc chắn.

Fig.2 thể hiện các kết quả đối với tác nhân gây bệnh virus và vi khuẩn khác nhau.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Sáng chế đề xuất thử nghiệm tại chỗ có khả năng phân biệt nhiễm virus và nhiễm khuẩn trong thời gian ngắn. Cụ thể, sáng chế đề xuất dụng cụ chẩn đoán tại chỗ bao gồm các chất đánh dấu xét nghiệm cho cả nhiễm virus và nhiễm khuẩn mà hỗ trợ hiệu quả cho bác sĩ y khoa trong việc phân biệt nhanh giữa nhiễm virus và nhiễm khuẩn. Thử nghiệm tại chỗ có các lợi thế sau đây:

1) Thử nghiệm này có thể làm giảm đáng kể chi phí chăm sóc sức khỏe bằng cách hạn chế chẩn đoán nhằm dẫn đến việc sử dụng quá mức và sử dụng sai thuốc kháng sinh.

2) Tính hiệu quả và đảm bảo của thử nghiệm này là ở chỗ tính kháng thuốc kháng sinh sẽ được giảm, do thuốc kháng sinh sẽ chỉ được sử dụng khi bị nhiễm khuẩn.

3) Thử nghiệm này sẽ làm tăng danh mục chẩn đoán của phòng khám của bác sĩ và các dược sĩ.

Do đó, sáng chế góp phần sử dụng thuốc kháng sinh một cách thích hợp. Điều này có nghĩa là chỉ sử dụng thuốc kháng sinh khi cần thiết và, nếu cần, thì sử dụng chúng một cách đúng đắn.

Thuốc kháng sinh không chống lại các bệnh nhiễm trùng do virus gây ra như cảm lạnh, cúm, viêm họng và viêm phế quản. Thậm chí nhiều bệnh nhiễm trùng xoang và nhiễm trùng tai có thể trở nên tốt hơn mà không cần dùng thuốc kháng sinh. Thay vào đó, việc làm giảm triệu chứng có thể là lựa chọn điều trị tốt nhất cho các bệnh nhiễm trùng này. Sử dụng thuốc kháng sinh cho bệnh nhiễm virus, chẳng hạn như cảm lạnh, cúm, viêm họng và viêm phế quản:

- sẽ không chữa khỏi nhiễm trùng;
- sẽ không giữ cho người khác khỏi bị lây bệnh;
- sẽ không giúp bạn hoặc con bạn cảm thấy tốt hơn;
- có thể gây ra các tác dụng phụ không cần thiết và có hại; và
- có thể góp phần làm kháng thuốc kháng sinh, đó là khi vi khuẩn có khả năng chống lại các tác dụng của kháng sinh và tiếp tục gây hại.



Thuốc kháng sinh được kê không đúng có lợi ích điều trị không chắc chắn và khiến bệnh nhân gặp phải các biến chứng tiềm ẩn của liệu pháp kháng sinh. Do đó, kết quả nhanh chóng thu được từ xét nghiệm tại chỗ cho phép chẩn đoán chính xác và hỗ trợ bác sĩ trong quyết định kê đơn thuốc chính xác.

Đối với thử nghiệm tại chỗ, các dụng cụ khác có thể được sử dụng, ví dụ, dụng cụ thử nghiệm miễn dịch dòng bên hoặc hệ thống cảm biến quang, mà được thiết kế để tương tác với dụng cụ máy tính di động như được mô tả trong WO2016/116181.

Do đó, theo một phương án của sáng chế, dụng cụ phân tích mẫu được sử dụng, ví dụ băng thử, để xác định là nhiễm khuẩn hay nhiễm virus. Băng thử bao gồm vùng đặt mẫu và vùng phát hiện. Theo phương pháp này, mẫu được thu thập và được chuyển sang băng thử. Vùng phát hiện bao gồm ít nhất một thuốc thử đặc hiệu với chất đánh dấu vi khuẩn và ít nhất một thuốc thử đặc hiệu với chất đánh dấu virus.

Theo một phương án, chất đánh dấu đối với sự nhiễm virus là Mx-B và chất đánh dấu đối với sự nhiễm khuẩn là protein phản ứng C (CRP). Mức protein Mx-B cao có liên quan chặt chẽ với sự nhiễm trùng toàn thân do virus. Các protein myxovirus (Mx) có thể cảm ứng interferon đóng vai trò quan trọng trong việc chống lại một loạt các bệnh nhiễm virus. Các protein tương đồng Mx ức chế các virus ARN và ADN.

Gần đây đã thấy rằng protein Mx-B là protein quan trọng giúp vận chuyển các thành phần virus ra ngoài tế bào [2]. Ví dụ, protein HIV sẽ được vận chuyển và được loại trừ bởi protein Mx-B, và không phải bởi protein Mx-A [1]. Do đó, thử nghiệm tại chỗ này sử dụng protein Mx-B, bởi nó chỉ có 63% tương đồng với protein Mx-A, và do đó là protein Mx chức năng trong họ Mx GTPaza [3]. Thấy rằng Mx-B ức chế mạnh mẽ sự nhiễm virus bằng cách làm giảm mức ADN virus hợp nhất. Hơn nữa, protein Mx-B nằm trong nhân và tế bào chất. Ngược lại, protein Mx-A chỉ nằm trong tế bào chất [4]. Dựa vào những phát hiện mới này, các tác giả chọn Mx-B làm chất đánh dấu tin cậy đối với sự nhiễm virus.

Protein phản ứng C (CRP), protein pha cấp tính được tạo ra bởi gan để đáp ứng lại sự nhiễm trùng, là chất đánh dấu sinh học tin cậy đối với sự nhiễm khuẩn. Các mức CRP ở những người khỏe mạnh được xem là thấp hơn 0,5 mg/L, và các mức CRP tăng cao ở các tình trạng nhiễm.

Procanxitonin (PCT) là hormon polypeptit với 116 axit amin. Protein này sẽ được tạo ra chủ yếu bởi các tế bào C của tuyến giáp. Thông thường, có một mức rất giới hạn PCT trong máu. Ngược lại, khi bị nhiễm khuẩn, protein này sẽ được biểu hiện và được tìm thấy ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 ng/ml đến 2 ng/ml. Ưu điểm của protein này là nó sẽ được phát hiện sau 6 giờ nhiễm trùng, trong khi CRP sẽ được phát hiện trong thời gian sớm nhất là 12-16 giờ.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến xét nghiệm sàng lọc nhanh để nhận diện Mx-B và/hoặc CRP/PCT/BPI trong mẫu của bệnh nhân. Mẫu có thể là, ví dụ mẫu máu ngoại vi, dịch hút mũi họng, nước mắt, dịch tủy sống và dịch hút tai giữa.

Protein tăng tính diệt khuẩn/tính thấm (BPI) là protein vạn năng được định vị trong các bạch cầu trung tính và mô mà có thể đóng vai trò then chốt trong việc bảo vệ vật chủ chống lại vi khuẩn Gram âm và nội độc tố của chúng bằng chức năng khử và trung hòa nội độc tố và kháng sinh của nó. BPI được xem là chất đánh dấu sinh học bổ sung cho xét nghiệm tại chỗ cải tiến để cải thiện độ tin cậy và độ chính xác của xét nghiệm. Khi bị nhiễm khuẩn, protein này sẽ được biểu hiện và được tìm thấy ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 µg/ml đến 20 µg/ml.

Do đó, một phương án khác của sáng chế đề cập đến xét nghiệm tại chỗ để nhận diện Mx-B, BPI và/hoặc CRP/PCT trong mẫu của bệnh nhân.

Theo một phương án của sáng chế, vùng phát hiện bao gồm ít nhất một thuốc thử có ái lực liên kết với chất đánh dấu virus Mx-B và ít nhất một thuốc thử có ái lực liên kết với chất đánh dấu vi khuẩn CRP/PCT và tùy ý, ít nhất một thuốc thử có ái lực liên kết với BPI sao cho, khi các chất đánh dấu có trong mẫu tiếp xúc với các thuốc thử tương ứng, phức hợp được đánh dấu được tạo ra. Vùng phát hiện bao gồm đối tác liên kết chất đánh dấu vi khuẩn mà liên kết với phức hợp được đánh dấu thứ nhất và đối tác liên kết chất đánh dấu virus mà liên kết với phức hợp được đánh dấu thứ hai. Sau đó, mẫu được phân tích đối với sự có mặt của chất đánh dấu virus và/hoặc chất đánh dấu vi khuẩn.

Vùng phát hiện có thể được chức năng hóa bằng cách cố định các phân tử thụ thể khác nhau mà liên kết đặc hiệu với các chất đánh dấu tương ứng. Các phân tử thụ thể có thể được chọn từ nguồn gốc tự nhiên, ví dụ các kháng thể, các đoạn kháng thể

hoặc dạng tương tự. Các phân tử thụ thể có thể là các phân tử được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp, ví dụ, các aptame. Vùng phát hiện bao gồm ít nhất một vùng cảm biến trên đó được sắp xếp các kháng thể hoặc các thụ thể truyền tính đặc hiệu khác, chẳng hạn như các aptame, liên kết đặc hiệu với các chất đánh dấu tương ứng cần được phát hiện làm các thụ thể để cảm biến các chất đánh dấu tương ứng. Do đó, đạt được sự chức năng hóa hiệu quả, dễ áp dụng của bề mặt vùng cảm biến.

Các kháng thể hoặc các thụ thể truyền tính đặc hiệu khác ví dụ các aptame có tính chọn lọc cao để phát hiện các chất phân tích cụ thể; do đó, chúng đặc biệt thích hợp để nhận diện các chất đánh dấu bệnh cụ thể. Liên quan đến các thụ thể có thể có, các kháng thể được sắp xếp trên bề mặt cảm biến hoặc các thụ thể truyền tính đặc hiệu khác chẳng hạn như các aptame để liên kết chất phân tích sẽ được phát hiện và, trong quá trình này, dẫn đến sự thay đổi về tính chất. Theo một số phương án, các aptame có ưu điểm ở chỗ chúng ổn định hơn và do đó mang chức năng vĩnh viễn.

Khi các aptame chia sẻ các ứng dụng tương tự cho các kháng thể, nhiều phương pháp phát hiện tận dụng lợi thế của các kháng thể có thể được phát triển thành các phương pháp trên cơ sở aptame. Ví dụ, hầu hết các thử nghiệm miễn dịch cho các phân tử nhỏ là các thử nghiệm cạnh tranh dựa trên việc thay thế các kháng thể liên kết bề mặt bởi chất phân tích trong dung dịch.

Một phương án về dụng cụ của sáng chế bao gồm vùng đặt mẫu.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến dụng cụ mà bao gồm thêm vùng thuốc thử. Vùng thuốc thử bao gồm ít nhất một thuốc thử đặc hiệu với chất đánh dấu virus sao cho, khi chất đánh dấu virus có trong mẫu tiếp xúc với thuốc thử đã nêu, phức hợp thuốc thử virus được đánh dấu được tạo ra. Ngoài ra, vùng thuốc thử bao gồm ít nhất một thuốc thử đặc hiệu với chất đánh dấu vi khuẩn sao cho, khi chất đánh dấu vi khuẩn có trong mẫu tiếp xúc với thuốc thử đã nêu sẽ tạo thành phức hợp thuốc thử vi khuẩn được đánh dấu. Theo một phương án của sáng chế, vùng thuốc thử bao gồm một thuốc thử đặc hiệu với chất đánh dấu vi khuẩn CRP/PCT và một thuốc thử đặc hiệu với chất đánh dấu vi khuẩn BPI, sao cho, khi các chất đánh dấu vi khuẩn đã nêu có trong mẫu tiếp xúc với các thuốc thử đã nêu sẽ tạo thành các phức hợp được đánh dấu.

Vùng phát hiện trên dụng cụ bao gồm đối tác liên kết chất đánh dấu virus mà liên kết với phức hợp thuốc thử virus được đánh dấu và đối tác liên kết chất đánh dấu vi khuẩn mà liên kết với phức hợp thuốc thử vi khuẩn được đánh dấu. Dụng cụ có thể là băng thử sắc ký.

Theo một phương án ưu tiên, sự có mặt của chất đánh dấu virus hoặc chất đánh dấu vi khuẩn được chỉ ra bởi vạch xét nghiệm có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Sự có mặt của chất đánh dấu virus có thể được chỉ ra bởi vạch xét nghiệm thứ nhất trong khi sự có mặt của chất đánh dấu vi khuẩn được chỉ ra bởi vạch xét nghiệm thứ hai và/hoặc thứ ba. Theo một số phương án, vạch xét nghiệm thứ nhất hiển thị màu thứ nhất khi dương tính và vạch xét nghiệm thứ hai hiển thị màu thứ hai khác màu thứ nhất khi dương tính và/hoặc vạch xét nghiệm thứ ba hiển thị màu thứ ba khác màu thứ nhất và màu thứ hai khi dương tính. Theo các phương án trong đó vạch xét nghiệm thứ nhất, thứ hai và thứ ba được đặt ở cùng một chỗ trên dụng cụ phân tích mẫu, thuận lợi là có các màu sắc khác nhau được tạo thành khi vạch xét nghiệm thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba là dương tính.

Theo một phương án, hai hoặc ba vạch xét nghiệm cách nhau về mặt không gian trên dụng cụ. Theo phương án như vậy, màu sắc có thể giống nhau khi các vạch xét nghiệm là dương tính.

Theo một phương án của sáng chế, mẫu cần được phân tích được đặt lên chất mang. Chất mang có thể được làm từ một vật liệu sắc ký đơn, hoặc tốt hơn là một số vật liệu hoạt tính mao dẫn được làm từ các vật liệu giống hoặc khác nhau và được cố định trên bề mặt sau của chất mang. Các vật liệu này tiếp xúc gần với nhau để tạo thành đường vận chuyển mà chất lỏng được dẫn dọc theo đó bởi các lực mao dẫn chảy từ vùng đặt mẫu, đi qua vùng thuốc thử, tới một hoặc nhiều vùng phát hiện.

Tốt hơn là, mẫu được đặt trực tiếp lên chất mang bằng cách nhúng vùng đặt mẫu của chất mang vào mẫu. Theo cách khác, việc đặt mẫu lên chất mang có thể được thực hiện bằng cách thu thập mẫu với thành phần tẩy sạch khô hoặc ướt mà mẫu có thể được chuyển từ đó, tùy ý sau khi làm ẩm, đến vùng đặt mẫu của chất mang. Thông thường, thành phần tẩy sạch là vô trùng và có thể khô hoặc được xử lý trước với chất lỏng trước bước thu thập. Các vật liệu phù hợp cho các thành phần tẩy sạch theo sáng chế có thể bao gồm các vật liệu tổng hợp, vải dệt hoặc vải sợi.

Tùy thuộc vào loại phương pháp phát hiện, các thuốc thử khác nhau có mặt trong vùng thuốc thử, được đặt giữa vùng đặt mẫu và vùng phát hiện. Trong thử nghiệm miễn dịch kiểu bán kẹp, ưu tiên có thuốc thử không cố định, được đánh dấu trong vùng thuốc thử mà đặc hiệu với chất đánh dấu virus và vi khuẩn cần được phát hiện. Do đó, khi chất đánh dấu virus hoặc chất đánh dấu vi khuẩn có trong mẫu tiếp xúc với thuốc thử virus hoặc vi khuẩn được đánh dấu tương ứng có trong vùng thuốc thử, phức hợp được đánh dấu được tạo thành giữa chất đánh dấu và thuốc thử được đánh dấu tương ứng. Kết quả là, phức hợp được đánh dấu có khả năng tạo thành phức hợp khác với virus cố định hoặc đối tác liên kết chất đánh dấu vi khuẩn trong vùng phát hiện. Trong thử nghiệm miễn dịch cạnh tranh, vùng thuốc thử tốt hơn là chứa chất tương tự đánh dấu không cố định, được đánh dấu mà cạnh tranh với đối tác liên kết chất đánh dấu cố định trong vùng phát hiện với chất đánh dấu. Các đối tác liên kết chất đánh dấu trong vùng thuốc thử và trong vùng phát hiện tốt hơn là kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng hoặc kháng thể tái tổ hợp hoặc các đoạn của các kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với chất đánh dấu tương ứng.

Việc phát hiện chất đánh dấu có thể đạt được trong vùng phát hiện. Phân tử cố định liên kết với phức hợp được đánh dấu hoặc chất tương tự đánh dấu được đánh dấu bằng phản ứng miễn dịch hoặc phản ứng khác trong vùng phát hiện, do đó tạo ra vạch xét nghiệm có thể nhìn thấy trong vùng phát hiện trong suốt quy trình. Tốt hơn là, nhãn là nhãn có thể phát hiện được bằng quang học. Việc tạo thành phức hợp ở vùng phát hiện giữ cố định nhãn và vạch xét nghiệm có thể nhìn thấy bằng mắt thường, chỉ ra kết quả xét nghiệm dương tính. Thích hợp là các nhãn trực tiếp, ví dụ, cụ thể là các nhãn vàng có thể được nhận biết tốt nhất bằng mắt thường. Ngoài ra, thiết bị đọc kết quả điện tử (ví dụ trên cơ sở bộ biến đổi trắc quang, âm thanh, điện trở, điện thế và/hoặc dòng điện) có thể được sử dụng để thu được kết quả chính xác hơn và bán định lượng chất phân tích. Các nhãn thích hợp khác có thể là latex, các chất huỳnh quang hoặc các chất lân quang.

Theo một phương án, độ nhạy của các xét nghiệm thử nghiệm miễn dịch dòng bên đọc được bằng mắt được tăng cường bằng cách thêm lượng nhỏ thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc hạt latex huỳnh quang liên hợp với vật liệu liên hợp ban đầu. Khi vạch xét nghiệm phổ nhìn thấy được xuất hiện một cách rõ ràng, kết quả xét nghiệm được quan sát và ghi lại.

Theo một phương án của sáng chế, các thuốc thử có cấu tạo sao cho vạch xét nghiệm có thể nhìn thấy tương ứng với sự có mặt của chất đánh dấu virus sẽ tách biệt với các vạch xét nghiệm tương ứng với sự có mặt của các chất đánh dấu vi khuẩn. Do đó, có thể dễ dàng xác định xem mẫu chứa chất đánh dấu vi khuẩn hay chất đánh dấu virus (hay cả hai) chỉ đơn giản bằng vị trí hiện hình của các vạch xét nghiệm trong vùng phát hiện. Theo một phương án ưu tiên khác, các thuốc thử có thể được chọn sao cho các vạch xét nghiệm có màu khác nhau được hiện hình. Tức là, sự có mặt của chất đánh dấu virus sẽ gây ra sự hiện hình của vạch có màu khác so với vạch được hiện hình bởi sự có mặt của chất đánh dấu vi khuẩn. Ví dụ, nhãn tương ứng với thuốc thử nhận biết chất đánh dấu virus có thể là đỏ, trong khi nhãn tương ứng với thuốc thử nhận biết các chất đánh dấu vi khuẩn có thể là xanh lục. Các nhãn có màu khác mà có thể được gắn với các thuốc thử không ổn định đã được biết đến. Một số ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vàng keo, selen keo, cacbon keo, các hạt latex, các hạt thuận từ, chất huỳnh quang và chất phát quang hóa học và hỗn hợp của chúng.

Fig.1 thể hiện băng thử sắc ký với vạch xét nghiệm tương ứng với sự có mặt của chất đánh dấu virus, vạch xét nghiệm tách biệt thứ hai phát hiện sự có mặt của chất đánh dấu vi khuẩn thứ nhất và vạch xét nghiệm tách biệt thứ ba phát hiện sự có mặt của chất đánh dấu vi khuẩn thứ hai. Mẫu được đặt vào vùng đặt mẫu của băng thử. Như được thể hiện trên Fig.1, mẫu sau đó đi qua vùng thuốc thử chứa ít nhất một đối tác liên kết virus được đánh dấu và ít nhất một đối tác liên kết vi khuẩn được đánh dấu. Đối tác liên kết virus được đánh dấu có khả năng liên kết đặc hiệu với chất đánh dấu virus quan tâm để tạo thành thể liên hợp do đó có khả năng liên kết đặc hiệu với một thuốc thử hoặc đối tác liên kết đặc hiệu trong vùng phát hiện. Đối tác liên kết vi khuẩn được đánh dấu có khả năng liên kết đặc hiệu với chất đánh dấu vi khuẩn quan tâm để tạo thành thể liên hợp do đó có khả năng liên kết đặc hiệu với một thuốc thử hoặc đối tác liên kết đặc hiệu khác trong vùng phát hiện.

Băng thử còn bao gồm vùng phát hiện chứa ít nhất một phần thứ nhất để phát hiện chất đánh dấu virus, ví dụ vạch xét nghiệm, bao gồm đối tác liên kết đặc hiệu được cố định, bổ sung cho phức hợp thuốc thử virus được tạo thành bởi chất đánh dấu virus và đối tác liên kết được đánh dấu của nó. Do đó, ở vạch xét nghiệm, các đối tác liên kết ở vùng phát hiện giữ các đối tác liên kết virus được đánh dấu từ vùng thuốc thử cùng với các chất đánh dấu virus liên kết của chúng. Sự định vị này của chất đánh

dấu virus với các đối tác liên kết được đánh dấu của nó tạo ra dấu hiệu ở vạch xét nghiệm. Ở vạch xét nghiệm, sự có mặt của chất đánh dấu virus được xác định bằng kết quả đọc định tính và/hoặc định lượng của dấu hiệu của vạch xét nghiệm thu được nhờ sự tích lũy của các đối tác liên kết được đánh dấu.

Vùng phát hiện cũng bao gồm ít nhất một phần để phát hiện ít nhất một chất đánh dấu vi khuẩn, ví dụ vạch xét nghiệm, bao gồm đối tác liên kết đặc hiệu cố định, bổ sung cho phức hợp thuốc thử vi khuẩn được tạo thành bởi chất đánh dấu vi khuẩn và đối tác liên kết được đánh dấu của nó. Vì vậy, ở vạch xét nghiệm, các đối tác liên kết vùng phát hiện giữ các đối tác liên kết vi khuẩn được đánh dấu từ vùng thuốc thử cùng với các chất đánh dấu vi khuẩn liên kết của chúng. Sự định vị này của chất đánh dấu vi khuẩn với các đối tác liên kết được đánh dấu của nó tạo ra dấu hiệu ở vạch xét nghiệm. Ở vạch xét nghiệm, sự có mặt của chất đánh dấu vi khuẩn được xác định bằng kết quả đọc định tính và/hoặc định lượng của dấu hiệu của vạch xét nghiệm thu được nhờ sự tích lũy của các đối tác liên kết được đánh dấu.

Theo một phương án của sáng chế, vùng phát hiện có thể chứa thêm vạch xét nghiệm để phát hiện chất đánh dấu vi khuẩn thứ hai.

Một ví dụ về xét nghiệm tại chỗ để phân biệt nhiễm virus và nhiễm khuẩn như được thể hiện trên Fig.1. Như được thảo luận ở trên, Mx-B là chất đánh dấu giúp chẩn đoán sự nhiễm virus, trong khi CRP và BPI là các chất đánh dấu giúp chẩn đoán sự nhiễm khuẩn. Kết quả dương tính đối với protein Mx-B, cùng với kết quả âm tính đối với protein CRP/PCT và BPI chỉ ra sự nhiễm virus. Kết quả dương tính đối với CRP/PCT và BPI cùng với kết quả âm tính đối với protein Mx-B chỉ ra sự nhiễm khuẩn. Kết quả dương tính yếu đối với Mx-B, CRP/PCT và BPI chỉ ra sự nhiễm cả vi khuẩn và virus (đồng nhiễm trùng). Kết quả âm tính đối với Mx-B, CRP/PCT và BPI chỉ ra việc không có nhiễm khuẩn hoặc nhiễm virus. Trong khi các vạch màu cụ thể được thảo luận trong ví dụ này, các màu khác hoặc các màu giống nhau ở các vị trí khác nhau trên băng thử để chỉ ra chất đánh dấu virus hoặc chất đánh dấu vi khuẩn, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Khi sự hiện hình của các vạch có màu khác nhau được dùng, các vạch có thể có hoặc không được tách biệt bởi khoảng trống. Trong trường hợp các vạch không được tách biệt bởi khoảng trống, các nhãn được chọn sao cho màu được nhìn thấy khi có

mặt cả hai chất đánh dấu khác các màu được nhìn thấy khi chỉ có mặt từng chất đánh dấu riêng biệt. Ví dụ, sự có mặt của chất đánh dấu virus có thể được chỉ ra bởi vạch màu đỏ; sự có mặt của chất đánh dấu vi khuẩn được chỉ ra bởi vạch màu xanh lục; và sự có mặt của cả hai chất đánh dấu được chỉ ra bởi vạch màu tím (kết hợp của màu đỏ và màu xanh lục).

Theo một phương án khác, băng thử cũng có thể bao gồm phần đối chứng mà cho biết chức năng của băng thử. Nếu có, phần đối chứng có thể được thiết kế để truyền tín hiệu đến người dùng rằng dụng cụ đã hoạt động. Ví dụ, phần đối chứng có thể chứa thuốc thử (ví dụ, kháng thể) mà sẽ liên kết với các thuốc thử được đánh dấu từ vùng thuốc thử. Theo một phương án thay thế khác, phần đối chứng có thể chứa virus cố định và các chất đánh dấu vi khuẩn mà sẽ phản ứng với thuốc thử được đánh dấu dư từ vùng thuốc thử. Phần đối chứng có thể được đặt ở trước hoặc sau vùng phát hiện. Bộ chỉ báo đối chứng dương cho người dùng biết rằng mẫu đã thấm qua dụng cụ xét nghiệm một khoảng cách cần thiết.

Chất tương đồng Mx cũng có thể được phát hiện trong khoảng 10% ca nhiễm khuẩn đi kèm sốt. Để tăng cường độ tin cậy của xét nghiệm, giới hạn đối với protein Mx-B được đặt trong khoảng 0,01 – 0,05 U/10.000 bạch cầu, tốt hơn là 0,025 U/10.000 bạch cầu. Đối với CRP, giới hạn được đặt trong khoảng 5 – 100 mg/L, hoặc trong khoảng 25 -75 mg/L, hoặc là 40 mg/L. Đối với PCT, giới hạn được đặt trong khoảng từ 0,5 ng/ml đến > 2 ng/ml. Đối với BPI, giới hạn được đặt trong khoảng từ 1 µg/ml đến > 10 µg/ml.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Các ví dụ sau đây được nêu ra để hỗ trợ hiểu thêm về sáng chế mà không nhằm mục đích và không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Các ví dụ không bao gồm các phần mô tả chi tiết của các phương pháp thông thường. Các phương pháp như vậy đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

#### **Ví dụ 1 – Mô tả thử nghiệm**

Thử nghiệm tại chỗ được thực hiện với dụng cụ dòng bên. Các thuốc thử thích hợp cần cho mỗi thử nghiệm đã được bao gồm trong hộp Catridge.



Bước A: Do lực kết dính, giọt máu (xấp xỉ 0,005 ml – 0,010 ml) được chuyển từ Catridge vào dụng cụ.

Bước B: Đầu tiên, các tế bào trong giọt máu được phân giải với xấp xỉ 0,001 ml đệm phân giải bao gồm (NP-40 20%, Tris-HCl 100 mM, pH=7,2, 0,05 natri azit).

Bước C: Máu sau khi phân giải được dẫn lên trên hai băng thử và do đó được ủ.

Bước D: Dung dịch kháng thể 1 kháng Mx-B liên kết với protein Mx-B có thể có sẵn trong máu. Kháng thể này đã được liên hợp với chất đánh dấu được đánh dấu.

Bước D: Protein Mx-B đã liên kết sẽ được dẫn qua dung dịch chất mang thứ hai, trong đó kháng thể thứ hai kháng Mx-B được đặt. Chỉ protein Mx-B đã liên kết với kháng thể được đánh dấu thứ nhất sẽ được liên kết từ kháng thể thứ hai.

Bước E: Sau khi rửa dung dịch chất mang, kháng thể đã được đánh dấu và liên kết thứ nhất được làm cho có thể nhìn thấy dưới dạng phản ứng màu trên băng.

Bước F: Việc phát hiện CRP/PCT/BPI được thực hiện như được mô tả từ bước A đến bước E, trong khi một kháng thể kháng CRP/PCT và một kháng thể kháng BPI được sử dụng trên băng thử thứ hai.

#### Ví dụ 2 – Quy trình xét nghiệm

Trên hai xe cứu thương khác nhau, các bệnh nhân không rõ lai lịch đã được xét nghiệm protein Mx-A, protein Mx-B, CRP/PCT và BPI từ máu toàn phần. Tất cả bệnh nhân đã ký giấy thỏa thuận theo Thỏa thuận Helsinki rằng dữ liệu của họ chỉ nhằm mục đích nghiên cứu. 113/5000. Sau đó, tiền sử bệnh được tiếp tục điều tra và nguồn gốc của nhiễm trùng đã được xác định. Do đó, 120 ca nhiễm virus và 50 ca nhiễm khuẩn có thể được phân biệt. Kết quả của việc điều tra này được ghi lại trên Fig.2. Với sự trợ giúp của protein Mx-B, 92% ca nhiễm virus đã được phát hiện. Ngược lại, chỉ 77% các bệnh do virus giống như vậy đã được phát hiện khi sử dụng protein Mx-A. Với sự trợ giúp của các protein xác định CRP/PCT/BPI, phổ phát hiện các bệnh do vi khuẩn đã tăng đến 90%. Nếu chỉ protein CRP và PCT được đo, thì chỉ 80% các bệnh do vi khuẩn sẽ được phát hiện. Do đó, sự kết hợp của các chất đánh dấu protein Mx-B cho các bệnh do virus và CRP/PCT/BPI cho các bệnh do vi khuẩn cho kết quả độ nhạy hoặc tính đặc hiệu phát hiện trên 90%.

#### Ví dụ 3 – Các kết quả

Mô tả các kết quả từ sự nhiễm virus: Để chứng minh rằng phản ứng màu có tác dụng, cả hai băng thử ở phía bên trái là các mẫu đối chứng. Băng giữa phía trên có màu, băng bên dưới vẫn không màu. Cả hai băng ở phía bên phải vẫn không màu.

Mô tả các kết quả từ sự nhiễm khuẩn:

Cả hai băng ở giữa vẫn không màu, một băng bên phải phía trên cũng vậy nhưng băng bên phải phía dưới có màu.

Mô tả các kết quả từ sự nhiễm trùng hỗn hợp: Băng giữa ở phía trên có màu và băng bên dưới cũng vậy.

Tài liệu tham khảo:

- [1] Haller, O., Dynamins are forever Mx-B inhibits HIV-1. *Cell Host Microbe*. 2013 Oct 16;14(4):371-3.
- [2] Wei W., et al., Accumulation of Mx-B/Mx2-resistant HIV-1 Capsid Variants During Expansion of the HIV-1 Epidemic in human populations. *EBioMedicine*. 2016 Jun; 8: 230–236.
- [3] Melen, K., et al., Human Mx-B protein, an interferon-alpha inducible GTPase, contains a nuclear targeting signal and is localized in the heterochromatin-region beneath the nuclear envelope. *J Biol Chem*. 1996 Sep 20;271(38):23478-86.
- [4] Gao, S., et al., Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like Mx-A. *Nature*. 2010 May 27;465(7297):502-6.
- [5] Wussow, P.v., et al., Humoral response to recombinant IFN- $\alpha$  2b in patients receiving recombinant IFN- $\alpha$  therapy. *J Interferon Res*. 1989 Sep;9 Suppl 1:S25-31
- [6] Jakschies, D., et al., Emergence and decay of the human MX homolog in mononuclear cells from cancer patients during and after IFN- $\alpha$  therapy. *J Biol Response Mod*. 1990 Jun;9(3):305-12.
- [7] Wussow, P.v., et al., The interferon-induced MX-homologous protein in patients with symptomatic HIV-1-infection. *AIDS*. 1990 Feb;4(2):119-24.
- [8] Wussow, P.v., et al., The human MX-homologous protein is specifically induced by type-I-IFNs. *Eur. J. Immunology*. 1990 Sep;20(9), 2015-2019.

- [9] Jakschies D., et al., Correlation of the antiproliferative effect and the Mx-homologous protein induction by IFNs in patients with malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 1990 Dec;95(6 Suppl):238S-241S.
- [10] Wussow, P.v., et al., Effective natural interferon-alpha therapy in recombinant interferon-alpha-resistant patients with hairy cell leukemia. *Blood.* 1991 Jul 1;78(1):38-43.
- [11] Wussow, P.v., et al., Treatment of anti RIFN- $\alpha$ -2 antibody positive CML-patients with natural IFN- $\alpha$ . *Br J Haematol.* 1991 Jun;78(2):210-6.
- [12] Jakschies, D., et al., The human IFN-induced Mx-homologous proteins identified by 2D SDS-PAGE is specifically induced by type-I-interferons. (1991). *Proc. Int. Meeting on 2-D-Electrophoresis London, 16.18.7.1991:* 163.
- [13] Towbin, H., et al., A whole blood immunoassay for the interferon-inducible human Mx-protein. *J Interferon Res.* 1992 Apr;12(2):67-74.
- [14] Jakschies, D., et al., Strong transient expression of the interferon-induced Mx-A-protein in hepatitis A, but not in acute hepatitis B and C. *Hepatology.* 1994 Apr;19(4):857-65.
- [15] Rump, J.A., et al., Common variable immunodeficiency (CVID) and Mx-A-protein expression in blood leucocytes. *Clin Exp Immunol.* 1995 Jul;101(1):89-93.
- [16] Al-Masri, A., et al., Intracellular staining of Mx proteins in cells from peripheral blood, bone marrow and skin. *Mol Pathol.* 1997 Feb;50(1):9-14.
- [17] Self W.H., et al., Diagnostic Accuracy of FebriDx: A Rapid Test to Detect Immune Responses to Viral and Bacterial Upper Respiratory Infections. *J Clin Med.* 2017 Oct 7;6(10).

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Dụng cụ thử nghiệm tại chỗ (point-of-care, POC) bao gồm:
  - a. vùng đặt mẫu, và
  - b. vùng phát hiện với thuốc thử phát hiện thứ nhất có ái lực liên kết với protein Mx-B (Mx-B), và thuốc thử phát hiện thứ hai có ái lực liên kết với protein phản ứng C hoặc procanxitonin (CRP/PCT), và  
trong đó dụng cụ có cấu tạo để phát hiện Mx-B và CRP/PCT trong mẫu từ đối tượng để phân biệt giữa nhiễm khuẩn và nhiễm virus.
2. Dụng cụ theo điểm 1, trong đó dụng cụ này còn bao gồm thuốc thử phát hiện thứ ba có ái lực liên kết với BPI.
3. Dụng cụ theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các thuốc thử phát hiện đã nêu được chọn từ các phân tử tổng hợp, các nucleotit, các axit nucleic, các aptame, các peptit, các protein, các enzym và các kháng thể.
4. Dụng cụ theo điểm 3, trong đó các thuốc thử phát hiện đã nêu được đánh dấu với chất đánh dấu có thể phát hiện.
5. Dụng cụ theo điểm 4, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện được chọn từ nhãn enzym, nhãn huỳnh quang, nhãn phóng xạ, nhãn hạt, hạt latec có màu, hạt nhựa có màu, hạt photpho có màu và hạt huỳnh quang.
6. Dụng cụ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, còn bao gồm cửa sổ xét nghiệm có cấu tạo để cho phép quan sát các kết quả xét nghiệm.
7. Dụng cụ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6, trong đó các thuốc thử phát hiện được liên hợp bằng phương pháp hóa học với chất đánh dấu có thể phát hiện để tạo thành phức hợp thuốc thử-chất đánh dấu cố định, không thuận nghịch.
8. Dụng cụ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 7, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện được liên hợp với thuốc thử phát hiện có cấu tạo để có thể nhìn thấy bởi người dùng khi mẫu dương tính với Mx-B và/hoặc CRP và/hoặc PCT và/hoặc BPI.
9. Dụng cụ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó dụng cụ có cấu tạo để đo định tính và/hoặc định lượng sự có mặt của Mx-B và/hoặc CRP và/hoặc PCT trong các mẫu máu của người.

10. Phương pháp phân biệt giữa nhiễm khuẩn và nhiễm virus ở đối tượng, phương pháp này bao gồm các bước:

- a. cung cấp mẫu thu được từ đối tượng đã nêu,
- b. cung cấp hệ thống xét nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9,
- c. đặt mẫu vào hệ thống xét nghiệm,
- d. quan sát sự không có mặt hoặc có mặt của phức hợp thuốc thử-chất đánh dấu có thể phát hiện để xác định xem mẫu có chứa Mx-B và/hoặc CRP và/hoặc PCT hay không, và trong đó
  - e. sự có mặt của Mx-B và sự không có mặt và/hoặc sự phát hiện ở mức thấp của CRP/PCT chỉ ra sự nhiễm virus,
  - f. sự không có mặt của Mx-B và sự có mặt của CRP/PCT chỉ ra sự nhiễm khuẩn;
  - g. sự có mặt của Mx-B và sự có mặt của CRP/PCT chỉ ra sự nhiễm trùng hỗn hợp; và
  - h. nhờ đó xác định tình trạng nhiễm trùng của bệnh nhân.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp này còn gồm bước quan sát sự không có mặt hoặc có mặt của phức hợp thuốc thử-chất đánh dấu có thể phát hiện để xác định xem liệu mẫu có chứa BPI hay không.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó:

- a. sự có mặt của Mx-B và sự không có mặt của CRP/PCT và BPI chỉ ra sự nhiễm virus,
- b. sự không có mặt của Mx-B và sự có mặt của CRP/PCT và BPI chỉ ra sự nhiễm khuẩn; và
- c. sự có mặt của Mx-B và sự có mặt của CRP/PCT và BPI chỉ ra sự nhiễm trùng hỗn hợp.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 12, trong đó mẫu là mẫu máu.

14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 13, trong đó sự có mặt của Mx-B và/hoặc CRP/PCT có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Fig. 1 A

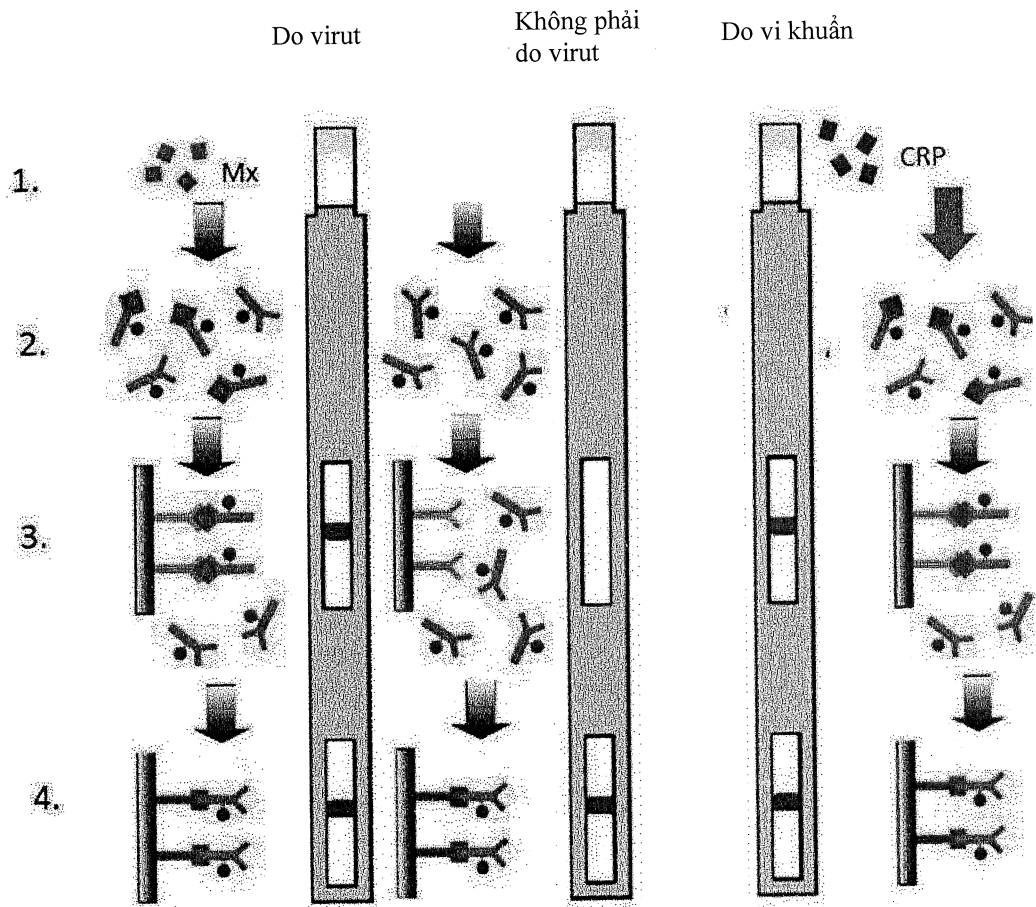


Fig. 1B

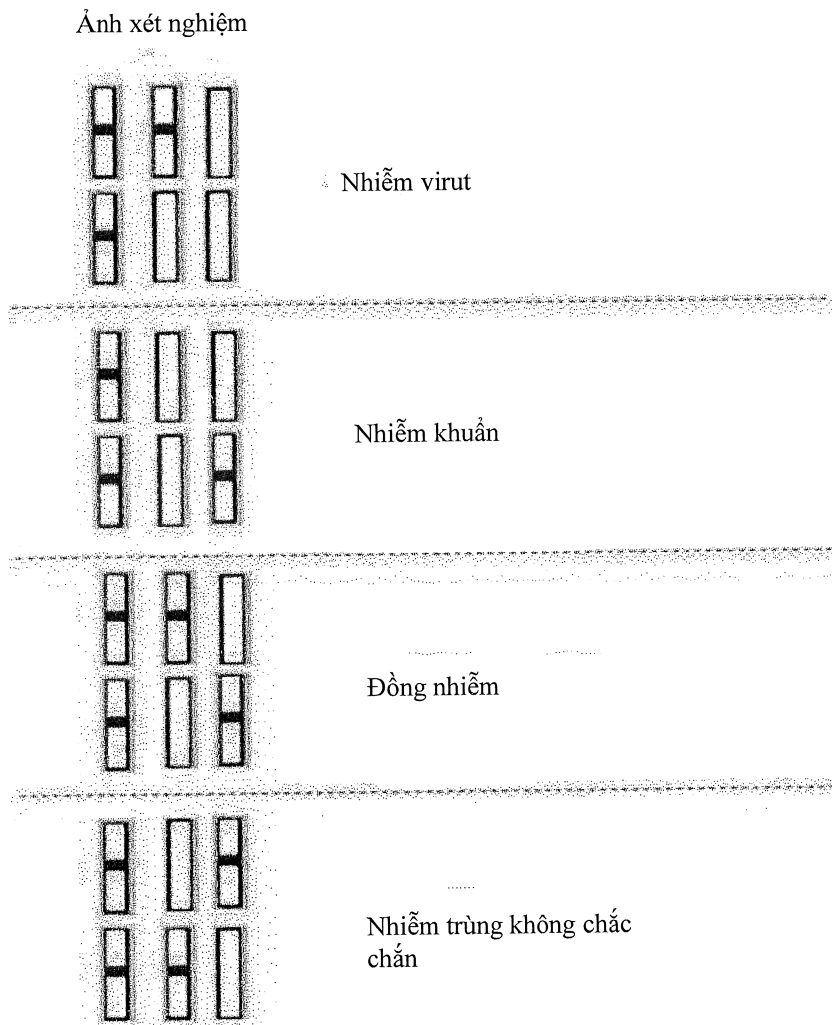




Fig. 2

		Mx-pos.B	Mx-pos. +	CRP/PCT	BPI	Protein Mx-A
VZV akut	3	3	0	0	0	3
VZV Zoster	15	9	4	2	1	9
EBV	13	11	0	2	1	10
CMV	11	9	0	2	1	9
Coxsackie	6	6	0	1	0	4
Influenza	31	30	0	1	1	28
Paramyxovirus	21	18	2	2	0	17
Togaviren	20	8	10	1	0	12
<b>Tổng</b>	<b>120</b>	<b>94</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>92</b>
<b>Phân trăm</b>			<b>92</b>		<b>13</b>	<b>77</b>
Staphylokokken	13	0	0	12	0	
Streptokokken	8	0	2	7	0	
Tbc	9	0	0	8	0	
Pseudomonas	4	1	0	1	1	
Enterokokken	3	0	0	3	0	
E. Coli	3	0	0	1	2	
Klebsiellen	1	0	0	1	1	
Branhamella	2	0	0	1	1	
Borrelie	2	0	0	2	0	
Corynebak.	3	0	1	2	0	
Yersinien	1	0	0	1	0	
Lysterien	1	1	0	1	0	
<b>Tổng</b>	<b>50</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>40</b>	<b>5</b>	
<b>Phân trăm</b>					<b>90</b>	
	Điểm thành công (hit) theo lý thuyết	Điểm thành công được tính toán				
Virut	50	46				
Vi khuẩn	50	45				
		<b>91</b>	Điểm thành công giữa sự nhiễm virut và nhiễm vi khuẩn khi cả hai xét nghiệm được thực hiện cùng nhau			