



(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)



1-0041905

(51)^{2020.01} G01N 33/543

(13) B

(21) 1-2020-02441

(22) 29/09/2017

(86) PCT/JP2017/035479 29/09/2017

(87) WO2019/064491 04/04/2019

(45) 25/12/2024 441

(43) 25/08/2020 389

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

1-3, Nihonbashi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027, Japan

(72) FUJIMURA Kengo (JP); KONDOU Junichi (JP); YAMAMOTO Mitsuaki (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐO CHẤT PHÂN TÍCH TRONG HUYẾT TƯƠNG NHŨ TRÁP
HOẶC HUYẾT THANH NHŨ TRÁP BẰNG THỬ NGHIỆM MIỄN DỊCH
NGỪNG KẾT LATEX

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp để tránh sự ảnh hưởng của mẫu máu lên sai số đo trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex. Sai số đo gây ra bởi mẫu máu trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex có thể được giảm bằng phương pháp bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc, trong pha lỏng, với các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích với sự có mặt của imidazol. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp và bộ kit chất phản ứng để đo chất phân tích trong mẫu máu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp giảm sai số đo gây ra bởi mẫu trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex bằng cách sử dụng các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phương pháp giảm sai số đo gây ra bởi mẫu máu, phương pháp này bao gồm bước thực hiện phản ứng ngưng kết miễn dịch latex với sự có mặt của imidazol.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex (còn được gọi là phân tích miễn dịch bằng cách đo độ đục của latex, và sau đây đôi khi được gọi là LTIA (latex turbidimetric immunoassay)) thường được sử dụng làm phương pháp đo đối với chất phân tích trong mẫu sinh học trong lĩnh vực xét nghiệm lâm sàng. LTIA là phương pháp đo sử dụng, ví dụ, các hạt latex mang kháng thể kháng chất phân tích, và phát hiện, ví dụ bằng các thiết bị quang học, mức độ ngưng kết (độ đục) của các hạt latex gây ra bởi sự gắn kết giữa kháng nguyên, là chất phân tích, và các hạt latex mang kháng thể.

Do việc sử dụng mẫu sinh học làm đích đo, có vấn đề về các sai số đo vì sự ảnh hưởng của các chất can thiệp khác nhau được chứa trong mẫu. Cụ thể là, do các thành phần chất béo được chứa trong mẫu máu của bệnh nhân nhận nhũ tương lipid trong tĩnh mạch hoặc bệnh nhân bị tăng lipid-huyết, sai số đo bị gây ra bởi sự ảnh hưởng của thành phần chất béo.

Các kỹ thuật đã biết để tránh sự ảnh hưởng của thành phần chất béo trong phương pháp đo thành phần của mẫu máu bằng cách sử dụng các hạt chất mang

không tan bao gồm các hạt được bọc lộ trong các tài liệu sáng chế từ 1 đến 3.

Tài liệu sáng chế 1 bọc lộ phương pháp bao gồm bước thực hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể với sự có mặt của albumin, enzym có hoạt tính lipaza, và chất hoạt động bề mặt không ion để tránh sự ảnh hưởng của nhũ trấp trong mẫu thử nghiệm như huyết thanh hoặc huyết tương. Theo phương pháp này, chất béo trong mẫu được thay đổi cấu trúc bởi chất hoạt động bề mặt, và phần nhân của chất béo bị thoái biến bởi lipaza thành các axit béo mà, sau đó, được hấp phụ lên trên albumin. Việc này tránh được tác động can thiệp của nhũ trấp lên phản ứng kháng nguyên-kháng thể.

Tài liệu sáng chế 2 bọc lộ phương pháp, trong quá trình đo testosterone và estradiol bằng cách sử dụng các hạt có từ tính, loại trừ được sai số, gây ra bởi sự có mặt của lipit trong mẫu huyết thanh, bằng cách bổ sung lipaza vào mẫu.

Tuy nhiên, trong các phương pháp của tài liệu sáng chế 1 và tài liệu sáng chế 2 cần phải duy trì ổn định hoạt tính lipaza trong chất phản ứng cấu thành do cả hai phương pháp liên quan đến sự thoái biến bởi lipaza của các lipit có mặt trong mẫu và gây ra sai số đo.

Tài liệu sáng chế 3 bọc lộ phương pháp sử dụng phenol etoxylat đa nhân cùng với etoxylat rượu mạch thẳng bậc hai dùng làm chất hoạt động bề mặt không ion để loại bỏ độ đục gây ra bởi các thành phần lipit của mẫu máu như huyết thanh hoặc huyết tương. Tuy nhiên, tài liệu này chỉ mô tả việc khử độ đục gây ra bởi thành phần chất béo của mẫu, và không có sự mô tả cụ thể về phân tích miễn dịch ngưng kết bằng cách sử dụng các hạt chất mang không tan như các hạt latex.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-2006-71754

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-2013-200208

Tài liệu sáng chế 3: JP-A-H10-213582

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là tránh sự ảnh hưởng của mẫu máu lên sai số đo trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex.

Vấn đề cần giải quyết

Các tác giả sáng chế đã thực hiện nhiều nghiên cứu khác nhau để tránh sự ảnh hưởng của mẫu máu lên sai số đo trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex và, kết quả là, đã bất ngờ phát hiện ra rằng sự ảnh hưởng của mẫu máu lên sai số đo có thể tránh được bằng các chế phẩm đệm khác nhau trong pha lỏng trong đó mẫu được cho tiếp xúc với các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích. Sáng chế đã được hoàn thành dựa trên phát hiện này.

Do đó, sáng chế có các dấu hiệu dưới đây:

<1> Phương pháp giảm sai số đo gây ra bởi mẫu máu trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc, trong pha lỏng, với các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích với sự có mặt của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng.

<2> Phương pháp theo mục <1>, trong đó mẫu máu là huyết thanh hoặc huyết tương.

<3> Phương pháp theo mục <1> hoặc <2>, trong đó nồng độ của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng khi đo phản ứng ngưng kết không nhỏ hơn 37,5mM và không lớn hơn 375mM.

<4> Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ <1> đến <3>, trong đó thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex được dựa trên phương pháp đồng nhất.

<5> Phương pháp đo chất phân tích trong mẫu máu bằng thử nghiệm

miễn dịch ngưng kết latex, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc, trong pha lỏng, với các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích với sự có mặt của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng.

<6> Phương pháp theo mục <5>, trong đó mẫu máu là huyết thanh hoặc huyết tương.

<7> Phương pháp theo mục <5> hoặc <6>, trong đó nồng độ của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng khi đo phản ứng ngưng kết không nhỏ hơn 37,5mM và không lớn hơn 375mM.

<8> Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ <5> đến <7>, trong đó thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex được dựa trên phương pháp đồng nhất.

<9> Phương pháp đo chất phân tích trong mẫu máu bằng thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, phương pháp này bao gồm các bước dưới đây:

(1) cho mẫu tiếp xúc với imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng trong pha lỏng;

(2) bổ sung các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích vào pha lỏng sau bước (1); và

(3) đo phản ứng ngưng kết giữa chất phân tích và các hạt latex sau bước (2).

<10> Phương pháp theo mục <9>, trong đó mẫu máu là huyết thanh hoặc huyết tương.

<11> Phương pháp theo mục <9> hoặc <10>, trong đó nồng độ của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng ở bước (3) đo phản ứng ngưng kết của các hạt latex không nhỏ hơn 37,5mM và không lớn hơn 375mM.

<12> Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ <9> đến <11>, trong đó thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex được dựa trên phương pháp đồng nhất.

<13> Bộ kit chất phản ứng để đo chất phân tích trong mẫu máu bằng thử

thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, bộ kit này bao gồm:

(1) chất phản ứng thứ nhất chứa chất đệm chứa imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng; và

(2) chất phản ứng thứ hai chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích.

<14> Bộ kit chất phản ứng theo mục <13>, trong đó imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng được chứa với lượng để có thể điều chỉnh nồng độ của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng để không nhỏ hơn 37,5mM và không lớn hơn 375mM khi đo chất phân tích trong mẫu máu bởi thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex.

<15> Bộ kit chất phản ứng theo mục <13> hoặc <14>, trong đó thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex được dựa trên phương pháp đồng nhất.

<16> Chất phản ứng dạng lỏng để đo chất phân tích trong mẫu máu bằng thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, chất phản ứng này bao gồm imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng.

<17> Chất phản ứng dạng lỏng theo mục <16>, trong đó imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng được chứa với lượng để có thể điều chỉnh nồng độ của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng để không nhỏ hơn 37,5mM và không lớn hơn 375mM khi đo chất phân tích trong mẫu máu bởi thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex.

<18> Chất phản ứng dạng lỏng theo mục <16> hoặc <17>, trong đó thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex được dựa trên phương pháp đồng nhất.

<19> Chất làm giảm sai số đo gây ra bởi mẫu máu trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, chất này bao gồm imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng dùng làm hoạt chất.

Các tác dụng có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, bằng cách làm giảm sai số đo gây ra bởi mẫu máu trong thử

nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, có thể thực hiện phép đo chính xác.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex

LTIA là phương pháp đo chất phân tích như kháng nguyên hoặc kháng thể bằng cách sử dụng các hạt latex mang chất được giữ cố định có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích, và được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực xét nghiệm lâm sàng. Phương pháp LTIA dùng để đo kháng nguyên dưới dạng chất phân tích được phân loại sơ bộ thành: phương pháp bao gồm bước cho kháng nguyên dưới dạng chất phân tích phản ứng với các hạt latex mang kháng thể đã được giữ cố định kháng kháng nguyên để tạo ra phức chất miễn dịch kiểu kết cấu nhiều lớp, và đo chất phân tích (kháng nguyên) dựa trên mức độ ngưng kết của các hạt latex do sự hình thành của phức chất miễn dịch; và phương pháp bao gồm bước để các hạt latex đã được giữ cố định trên kháng nguyên cạnh tranh với kháng nguyên (chất phân tích) trong mẫu ức chế sự hình thành của phức chất miễn dịch của các hạt latex và kháng thể, và đo chất phân tích (kháng nguyên) từ mức độ ức chế sự ngưng kết của các hạt latex kết hợp với ức chế sự hình thành của phức chất miễn dịch.

Mẫu

Mẫu để sử dụng trong sáng chế là mẫu máu như máu toàn phần, huyết thanh hoặc huyết tương.

Giảm sai số đo

Trong LTIA, vì một số thành phần mẫu máu, các hạt latex mang chất được giữ cố định có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích thường bị ngưng kết là điều không nên xảy ra (sai số đo dương), hoặc thường không bị ngưng kết là điều nên xảy ra (sai số đo âm). Hiện tượng này được gọi là phản ứng không đặc hiệu và được biết đến là gây ra các sai số đo khác nhau.

Như được sử dụng ở đây, “giảm sai số đo” dùng để chỉ việc lấy gần đúng của

giá trị đo với sai số đo dương hoặc âm đã nêu ở trên đến giá trị đo thuần (giá trị thực).

Như được sử dụng ở đây, “sai số đo gây ra bởi mẫu máu” dùng để chỉ sai số đo tạo ra bởi phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi (các) thành phần của mẫu máu. (Các) thành phần của mẫu máu gây ra phản ứng không đặc hiệu có thể bao gồm các lipit như nhũ trấp, các lipit đơn hoặc các triglyxerit.

Sáng chế được hướng đến việc làm giảm sai số đo được tạo ra đặc biệt trong mẫu máu từ một cá nhân với các đặc tính nhũ trấp (cá nhân ở tình trạng giàu chất béo) hoặc cá nhân đã được nhận nhũ tương béo trong tĩnh mạch.

Nhũ tương béo

Nhũ tương béo có thể là nhũ tương béo dầu trong nước được điều chế bằng cách nhũ hóa dầu hoặc chất béo bằng chất nhũ hóa thành các hạt chất béo có đường kính hạt trung bình không lớn hơn 1µm, tốt hơn là không lớn hơn 0,5µm, tốt hơn nữa là không lớn hơn 0,3µm. Các nhũ tương béo khác nhau được sử dụng để truyền (tiêm trong tĩnh mạch) có thể được sử dụng. Các ví dụ về các sản phẩm thương mại bao gồm Intralipos (nhãn hiệu đã đăng ký, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), Intrafat (nhãn hiệu đã đăng ký, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), và Intralipid (nhãn hiệu đã đăng ký, Fresenius Kabi Japan). Các thành phần mỗi sản phẩm, được mô tả trong tờ hướng dẫn sử dụng, là dầu đậu nành tinh chế, lexithin noãn hoàng trứng tinh chế, glyxerin đậm đặc, natri hydroxit (chất điều chỉnh độ pH), v.v..

Nhũ tương béo có thể được điều chế bằng cách bổ sung dầu hoặc chất béo vào dung dịch của chất nhũ hóa phân tán trong nước, tiếp theo khuấy trộn hỗn hợp để điều chế nhũ tương thô, và sau đó nhũ hóa nhũ tương thô bằng phương pháp thông thường như phương pháp nhũ hóa ở áp suất cao. Trong trường hợp sử dụng phương pháp nhũ hóa ở áp suất cao, quá trình nhũ hóa có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng máy nhũ hóa như bộ đồng nhất hóa Manton Gaulin, và cho nhũ tương thô đi qua máy nhũ hóa khoảng từ 5 đến 50 lần trong điều kiện khoảng từ 20

đến 700kg/cm². Để thu được nhũ tương hạt mịn và ổn định, tốt hơn là quá trình nhũ hóa được thực hiện với sự có mặt của glucoza và/hoặc glyxerin. Phương pháp này có thể dễ dàng điều chế nhũ tương có đường kính hạt trung bình không lớn hơn 0,17µm. Chất nhũ hóa phụ trợ có thể được sử dụng nếu cần trong quá trình thực hiện quá trình nhũ hóa.

Dầu hoặc chất béo ăn được bất kỳ có thể được sử dụng làm dầu hoặc chất béo đã nêu ở trên. Các ví dụ về các dầu và chất béo được ưu tiên có thể bao gồm các dầu thực vật (ví dụ dầu đậu nành, dầu hạt bông, dầu cây rum, dầu ngô, dầu dừa, dầu cây hoa môi, và dầu cây tía tô), các dầu cá (ví dụ dầu gan cá thu), và các triglyxerit đã được xác định hóa học như các triglyxerit mạch trung bình [ví dụ Panacet (tên thương mại) và ODO (tên thương mại)] và các triglyxerit tổng hợp hóa học [ví dụ 2-linoleoyl-1,3-dioctanoyl glyxerol (8L8) và 2-linoleoyl-1,3-didecanoyl glyxerol (10L10)]. Các dầu và chất béo này có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc ở dạng phối hợp của hai hoặc nhiều chất trong số chúng. Chất nhũ hóa có thể sử dụng trong dược phẩm bất kỳ có thể được sử dụng làm chất nhũ hóa đã nêu ở trên. Các ví dụ cụ thể về các chất nhũ hóa được ưu tiên bao gồm phospholipit noãn hoàng trứng, phospholipit noãn hoàng trứng hydro hóa, phospholipit đậu nành, phospholipit đậu nành hydro hóa, và các chất hoạt động bề mặt không ion [ví dụ Pluronic F68 và HCO-60 (tên thương mại)]. Các chất nhũ hóa như vậy có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc ở dạng phối hợp của hai hoặc nhiều chất trong số chúng.

Đặc biệt tốt hơn là, dầu đậu nành được sử dụng làm dầu hoặc chất béo và phospholipit noãn hoàng trứng được sử dụng làm chất nhũ hóa để điều chế nhũ tương béo trong đó đường kính hạt trung bình của các hạt chất béo được điều chỉnh để không lớn hơn 0,3µm, tốt hơn nữa là không lớn hơn 0,17µm. Trong lúc không có giới hạn cụ thể về chế phẩm của nhũ tương béo, nhũ tương béo được ưu tiên lấy ví dụ chứa dầu hoặc chất béo với lượng khoảng 0,1 đến 30% trọng lượng/thể tích, tốt hơn là khoảng 1 đến 20% trọng lượng/thể tích, tốt hơn nữa là khoảng 2 đến 10%

trọng lượng/thể tích, chất nhũ hóa với lượng khoảng 0,01 đến 10% trọng lượng/thể tích, tốt hơn là khoảng 0,05 đến 5% trọng lượng/thể tích, tốt hơn nữa là khoảng 0,1 đến 1% trọng lượng/thể tích, và lượng nước thích hợp.

Nhũ tương béo có thể còn chứa đường như đường khử. Các ví dụ về đường khử bao gồm glucoza, sucroza, và maltoza. Các đường khử như vậy có thể được sử dụng dưới dạng hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất trong số chúng. Còn có thể sử dụng hỗn hợp của đường khử như vậy với sorbitol, xylitol, và/hoặc glyxerin. Việc bổ sung (các) đường này có thể được thực hiện sau hoặc trong quá trình điều chế nhũ tương. Nhũ tương béo được ưu tiên lấy ví dụ chứa đường chứa dầu hoặc chất béo với lượng khoảng 0,1 đến 30% trọng lượng/thể tích, tốt hơn là khoảng 1 đến 20% trọng lượng/thể tích, tốt hơn nữa là khoảng 2 đến 10% trọng lượng/thể tích, chất nhũ hóa với lượng khoảng 0,01 đến 10% trọng lượng/thể tích, tốt hơn là khoảng 0,05 đến 5% trọng lượng/thể tích, tốt hơn nữa là khoảng 0,1 đến 1% trọng lượng/thể tích, đường với lượng khoảng 1 đến 60% trọng lượng/thể tích, tốt hơn là khoảng 5 đến 40% trọng lượng/thể tích, tốt hơn nữa là khoảng 10 đến 30% trọng lượng/thể tích, và lượng nước thích hợp.

Nhũ tương béo có thể còn chứa chất chống tạo màu (ví dụ thioglyxerol hoặc dithiothreitol) để ngăn chặn sự tạo màu của nhũ tương béo trong quá trình vô khuẩn và lưu giữ, và/hoặc chất đệm [ví dụ L-histidin hoặc tris(hydroxymetyl)-aminometan] để làm ổn định độ pH của nhũ tương. Nói chung, chất chống tạo màu và chất đệm, mỗi chất có thể được sử dụng với lượng không lớn hơn khoảng 1%. Theo sáng chế, nhũ tương béo có thể còn chứa (các) vitamin (ví dụ vitamin A, các vitamin B, vitamin C, các vitamin D, các vitamin E, và các vitamin K). Các chất phụ gia này có thể được bổ sung trong lúc hoặc sau khi điều chế nhũ tương.

Phương pháp đo

Phương pháp đo LTIA có thể đo chất phân tích bằng cách quan sát quang học hoặc điện hóa học mức độ ngưng kết của các hạt latex. Việc quan sát quang học

có thể được thực hiện bằng phương pháp đo cường độ của ánh sáng tán xạ, hệ số hấp phụ, hoặc cường độ của ánh sáng truyền qua bằng thiết bị quang học (phương pháp điểm cuối, phương pháp tỷ lệ, hoặc phương pháp tương tự). Giá trị đo hệ số hấp phụ nhận được bằng cách đo mẫu được so sánh, ví dụ, với giá trị đo hệ số hấp phụ nhận được bằng cách đo chất chuẩn ((các) mẫu chứa (các) nồng độ đã biết của chất phân tích), bằng cách đó tính được nồng độ (giá trị định lượng) của chất phân tích được chứa trong mẫu. Việc đo hệ số hấp phụ của ánh sáng truyền qua hoặc ánh sáng tán xạ, hoặc tương tự có thể hoặc là đo một bước sóng hoặc đo hai bước sóng (hiệu hoặc tỷ lệ giữa các giá trị ở hai bước sóng). (Các) bước sóng đo thường được chọn nằm trong khoảng từ 500nm đến 800nm.

Quá trình đo chất phân tích trong mẫu theo sáng chế có thể được thực hiện hoặc bằng tay hoặc bằng cách sử dụng thiết bị như thiết bị đo. Thiết bị đo có thể hoặc là máy phân tích tự động đa năng hoặc thiết bị đo chuyên dụng (máy chuyên dụng). Tốt hơn là quá trình đo được thực hiện bằng quy trình bao gồm nhiều bước thao tác, như quy trình hai bước (quy trình hai chất phản ứng).

Chất phân tích

Không có giới hạn cụ thể được đặt vào chất phân tích sẽ được đo theo sáng chế miễn là chất này có thể được đo bằng phương pháp phân tích miễn dịch. Các ví dụ có thể bao gồm nhiều chất khác nhau như protein (kháng nguyên, haptên, kháng thể), carbohydrat, lipit, axit nucleic, và chất hóa học (hormon, dược chất). Trong số chúng, kháng nguyên, cụ thể là kháng nguyên protein, được ưu tiên dùng làm chất phân tích. Các ví dụ cụ thể có thể bao gồm, và không bị giới hạn ở, thụ thể IL-2 tan (soluble IL-2 receptor, sIL-2R), CRP, fibrin và các sản phẩm thoái biến fibrinogen, D-dime, fibrin tan (soluble fibrin, SF), lipoprotein(a) (Lp(a)), metalloprotease-3 gian bào (matrix metalloprotease-3, MMP-3), kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt (prostate-specific antigen, PSA), IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, kháng thể kháng streptolysin O, các yếu tố dạng thấp, transferin, haptoglobin, α 1-antitrypsin, α 1-axit

glycoprotein, α 2-macroglobulin, hemopexin, antithrombin-III, α -fetoprotein, kháng nguyên ung thư phôi (carcinoembryonic antigen, CEA), feritin, kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (hepatitis B surface antigen, HBs-Ag), kháng nguyên bề mặt kháng virus viêm gan B (anti-hepatitis B surface antigen, Anti-HBs), kháng nguyên e của virus viêm gan B (hepatitis B e antigen, HBe-Ag), kháng thể đối với kháng nguyên e của virus viêm gan B (antibody to hepatitis B e antigen, Anti-HBe), và kháng thể đối với kháng nguyên lõi của virus viêm gan B (Anti-HBc, antibody to hepatitis B core antigen).

Chất có ái lực đặc hiệu

Theo sáng chế, chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích, được mang trên các hạt latex, có thể được lấy ví dụ bởi protein, peptit, axit amin, lipid, carbohydrat, axit nucleic hoặc hapten. Trong khi không có giới hạn cụ thể về trọng lượng phân tử, nguồn gốc (tự nhiên hoặc tổng hợp), v.v.. của chất được mang, nó có thể là kháng thể hoặc kháng nguyên có thể được sử dụng trong phương pháp phân tích miễn dịch sử dụng phản ứng miễn dịch.

Kháng thể

Kháng thể để sử dụng trong sáng chế có thể là hoặc kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng, và tốt hơn là kháng thể đơn dòng. Bên cạnh phân tử kháng thể toàn phần, mảnh chức năng của kháng thể, có hoạt tính phản ứng kháng nguyên-kháng thể, có thể còn được sử dụng làm kháng thể theo sáng chế. Bên cạnh kháng thể thu được qua quy trình miễn dịch được thực hiện trên động vật thông thường (chuột nhắt, dê, cừu, v.v..), còn có thể sử dụng kháng thể (kháng thể khảm, kháng thể nhân hóa, kháng thể nhân hóa đầy đủ, v.v..) nhận được bằng cách thay đổi trình tự axit amin thành trình tự axit amin của loài động vật khác biệt với động vật được gây miễn dịch bằng chất kháng nguyên (chất phân tích), ví dụ bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Mảnh chức năng của kháng thể có thể là, ví dụ, $F(ab')_2$ hoặc Fab' , là mảnh có hoạt tính phản ứng kháng nguyên-kháng thể, hoặc kháng thể mạch đơn

(scFv). Mảnh chức năng này của kháng thể có thể được tạo ra bằng cách xử lý kháng thể, thu được theo cách đã nêu ở trên, bằng enzym phân giải protein (ví dụ pepsin hoặc papain).

Các hạt latex

Không có giới hạn cụ thể về các hạt latex để sử dụng trong sáng chế miễn là các hạt latex là các hạt thường được sử dụng dưới dạng chất phản ứng phân tích miễn dịch. Các hạt latex có thể nhận được bằng cách polyme hóa hoặc copolyme hóa nhiều loại monome khác nhau. Các ví dụ về các monome có thể sử dụng được bao gồm: các hợp chất thơm không no có thể polyme hóa bao gồm các monome có thể polyme hóa có nhóm phenyl, như styren, α -metyl styren, o-metyl styren, p-metyl styren, p-clorostyren, 4-vinylbenzoat, divinylbenzen và vinyl toluen, các monome có thể polyme hóa có nhóm phenyl và sulfonat, như styren sulfonat, divinylbenzen sulfonat, o-metyl styren sulfonat và p-metyl styren sulfonat, và các monome có thể polyme hóa có nhóm naphtyl, như 1-vinylnaphtalen, 2-vinylnaphtalen, α -naphtyl (met)acrylat và β -naphtyl (met)acrylat; các axit carboxylic không no có thể polyme hóa như axit (met)acrylic, axit itaconic, axit maleic và axit fumaric; các este của axit carboxylic không no có thể polyme hóa như metyl (met)acrylat, etyl (met)acrylat, n-butyl (met)acrylat, 2-hydroxyetyl (met)acrylat, glycidyl (met)acrylat, etylen glycol-di-(met)acrylat và tribromophenyl (met)acrylat; và các amit của axit carboxylic không no, các nitril không no có thể polyme hóa, các vinyl halogenua, và các dien liên hợp, như (met)acrylonitril, (met)acrolein, (met)acrylamit, N-metylol-(met)acrylamit, metylenbis(met)acrylamit, butadien, isopren, vinyl axetat, vinylpyridin, N-vinyl pyrrolidon, vinyl clorua, vinyliden clorua và vinyl bromua. Các monome này có thể được lựa chọn thích hợp phụ thuộc vào các đặc tính bề mặt, trọng lượng riêng, v.v.. cần thiết, và có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất trong số chúng.

Đường kính hạt trung bình của các hạt latex tốt hơn là nằm trong khoảng từ

0,02 μ m đến 1,6 μ m, tốt hơn nữa là từ 0,1 μ m đến 0,4 μ m xét về nồng độ của chất phân tích trong mẫu, độ nhạy phát hiện của thiết bị đo, v.v.. Để đạt được tính năng mong muốn như độ nhạy được cải thiện, nguyên liệu và kích thước hạt của các hạt latex được sử dụng có thể được lựa chọn thích hợp. Theo cách khác, các loại hạt latex khác nhau, khác biệt về nguyên liệu hoặc kích thước hạt, có thể được sử dụng phối hợp. Không có giới hạn cụ thể về nồng độ của các hạt latex khi đo phản ứng ngưng kết theo sáng chế; nồng độ có thể được đặt thích hợp phụ thuộc vào độ nhạy hoặc tính năng dự định.

Các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu

Chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích có thể được cố định và được mang trên các hạt latex bằng phương pháp đã biết như phương pháp hấp phụ vật lý (gắn kết kỵ nước), phương pháp gắn kết hóa học, hoặc phối hợp của chúng.

Phương pháp hấp phụ vật lý có thể được thực hiện theo cách đã biết: chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích và các hạt latex được trộn và cho tiếp xúc với nhau trong dung dịch như chất đệm, hoặc chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích, được hòa tan trong chất đệm, được cho tiếp xúc với các hạt latex mang.

Phương pháp gắn kết hóa học có thể được thực hiện theo cách đã biết như được mô tả, ví dụ, trong Clinical Pathology, Extra Issue, Special Edition No. 53 “*Immunoassay for Clinical Examination--Technology and Application*”, biên tập bởi Hiệp hội phòng thí nghiệm y học Nhật Bản, phát hành năm 1983 bởi Hội công bố bệnh học lâm sàng, hoặc “*New Biochemistry Experiment Course 1, Protein IV*”, biên tập bởi Hội sinh hóa Nhật bản, phát hành 1991 bởi Tokyo Kagaku Dojin. Cụ thể là, phương pháp gắn kết hóa học có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách trộn và cho chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích và chất mang tiếp xúc với chất phản ứng liên kết ngang hóa trị hai như glutaraldehyt, carbodiimide, imide este, hoặc maleimide để chất phản ứng liên kết ngang hóa trị hai phản ứng với nhóm amin, nhóm carboxyl, nhóm thiol, nhóm aldehyt, nhóm hydroxyl, hoặc nhóm tương tự, trong mỗi

chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích và chất mang.

Chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích, được mang trên các hạt latex, tốt hơn là gồm nhiều loại để tạo ra cấu trúc nhiều lớp. Ví dụ, khi chất có ái lực đặc hiệu là kháng thể đơn dòng, kháng thể đơn dòng có thể gồm nhiều loại có các vị trí nhận biết khác nhau. Khi chất có ái lực đặc hiệu là kháng thể đa dòng, kháng thể đa dòng này có thể được tạo dẫn xuất từ một loại kháng huyết thanh hoặc nhiều loại kháng huyết thanh. Ngoài ra, kháng thể đơn dòng và kháng thể đa dòng có thể được sử dụng phối hợp.

Để ức chế sự ngưng kết tự phát, phản ứng không đặc hiệu, v.v.. của các hạt latex mang, việc xử lý chẹn (xử lý che chắn) của chất mang có thể được thực hiện nếu cần bằng phương pháp đã biết bao gồm đưa chất phản ứng, ví dụ, protein như albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin, BSA), casein, gelatin, albumin trứng gà, hoặc muối của chúng, chất hoạt động bề mặt hoặc sữa khô không chứa chất béo tiếp xúc với bề mặt của các hạt latex để bằng cách đó phủ bề mặt hạt bằng chất phản ứng này.

Imidazol

Theo sáng chế, việc đo chất phân tích trong mẫu được thực hiện với sự có mặt của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng được phép có mặt hoặc được chứa trong chất lỏng phản ứng dùng để đo hoặc chất phản ứng dùng để đo.

Imidazol hoặc dẫn xuất imidazol có thể là hợp chất bất kỳ có khung imidazol. Các ví dụ có thể bao gồm các hợp chất đã biết như imidazol, 1-metylimidazol, 1-etylimidazol, 1-propylimidazol, 1-butyylimidazol, 1-phenylimidazol, 1-vinylimidazol, 1-alylimidazol, 1-benzyl-2-metylimidazol, 1-benzyl-2-formylimidazol, 1-benzyl-4-hydroxymetylimidazol, 1-benzyl-5-hydroxymetylimidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-imidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-2-metylimidazol, 2-metyimidazol, 2-etylimidazol,

2-propylimidazol, 2-butyylimidazol, 2-phenylimidazol, 2-formylimidazol, 2-hydroxymetylimidazol, 2-metyl-1-vinylimidazol, 2-butyl-4-formylimidazol, 2-butyl-4-hydroxymetylimidazol, 2-butyl-4-chloro-5-formylimidazol, 2-hydroxymetyl-1-benzyylimidazol, 2-hydroxymetyl-2-metylimidazol, 2-etyl-4-metylimidazol, 4-butyylimidazol, 4-formylimidazol, 4-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-1-tritylimidazol, 5-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-5-metylimidazol, 4-hydroxymetylimidazol hydroclorua, metylimidazol-4-carboxylat, etylimidazol-4-carboxylat, 1,2-dimetylimidazol, và 1,2,4-trimetylimidazol.

Muối của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol là muối chấp nhận được về mặt hóa học, và bao gồm muối kali, muối magie, muối lithi, muối canxi, và muối kẽm. Ngoài ra, muối của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol có thể là muối được chọn từ nhóm bao gồm adipat, alginat, xitrat, aspartat, benzoat, benzen sulfonat, bisulfat, butyrat, camphorat, camphorsulfonat, digluconat, glyxerophosphat, hemisulfat, heptanoat, hexanoat, fumarat, sesqui(fumarat), hydroclorat, dihydroclorat, trihydroclorat, hydrobromua, hydroiodua, 2-hydroxyetan sulfonat (isethionat), lactat, maleat, metansulfonat, nicotinat, 2-naphtalensulfonat, oxalat, pamoat, pectinat, persulfat, 3-phenylpropionat, picrat, pivalat, propionat, succinat, sulfat, bis(tartrat), tartrat, (L)tartrat, bis((L)tartrat), (D)tartrat, bis((L)tartrat), (DL)tartrat, bis((DL)tartrat), mesotartrat, bis(mesotartrat), thioxyanat, phosphat, glutamat, hydrocacbonat, bis((D)tartrat), bis(bromua), bis(sulfat), bis(phosphat), tris(hydroclorat), p-toluensulfonat, và undecanoat.

Theo sáng chế, sản phẩm thương mại có thể được sử dụng khi nó là imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng (sau đây đôi khi được gọi là imidazol hoặc hợp chất tương tự). Không có giới hạn cụ thể về nồng độ của imidazol hoặc hợp chất tương tự miễn là nó không ảnh hưởng đáng kể đến phản ứng chính, như phản ứng kháng nguyên-kháng thể, trong bước quy trình trong đó phản ứng ngưng

kết được đo sau khi trộn mẫu và chất phản ứng dùng để đo. Tuy nhiên, giới hạn dưới của nồng độ có thể là, ví dụ, cao hơn hoặc bằng 37,5mM, cao hơn hoặc bằng 45mM, cao hơn hoặc bằng 52,5mM, cao hơn hoặc bằng 60mM, cao hơn hoặc bằng 67,5mM, hoặc cao hơn hoặc bằng 75mM. Giới hạn trên của nồng độ có thể là, ví dụ, thấp hơn hoặc bằng 750mM, thấp hơn hoặc bằng 675mM, thấp hơn hoặc bằng 600mM, thấp hơn hoặc bằng 525mM, thấp hơn hoặc bằng 450mM, thấp hơn hoặc bằng 375mM, thấp hơn hoặc bằng 300mM, hoặc thấp hơn hoặc bằng 225mM.

Nồng độ của imidazol hoặc hợp chất tương tự tốt hơn là nằm trong khoảng từ 37,5 đến 750mM. Còn tốt hơn là, nồng độ này nằm trong khoảng như được định rõ bằng phối hợp của các giới hạn trên và dưới đã nêu ở trên, như khoảng từ 37,5 đến 675mM, 37,5 đến 600mM, 37,5 đến 525mM, 37,5 đến 450mM, 37,5 đến 375mM, hoặc 37,5 đến 300mM, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 37,5 đến 225mM, 45 đến 225mM, 52,5 đến 225mM, 60 đến 225mM, hoặc 67,5 đến 225mM, và đặc biệt tốt hơn là trong khoảng từ 75 đến 225mM.

Trong lúc không có vấn đề nếu nồng độ của imidazol hoặc hợp chất tương tự vượt quá 375mM, tác dụng thích hợp có thể đạt được ở nồng độ không lớn hơn 375mM. Một loại imidazol duy nhất hoặc nhiều loại imidazol có thể được sử dụng làm imidazol hoặc hợp chất tương tự. Trong trường hợp sử dụng nhiều loại imidazol, tốt hơn là tổng nồng độ của các loại imidazol có thể nằm trong khoảng đã nêu ở trên.

“Chất đệm chứa imidazol” được chứa trong chất phản ứng dùng để đo theo sáng chế có thể là chất đệm imidazol hoặc chất đệm khác với chất đệm imidazol, chứa imidazol hoặc hợp chất tương tự. Còn có thể sử dụng chất đệm imidazol phối hợp với chất đệm khác với chất đệm imidazol.

Khi phương pháp đo theo sáng chế là phương pháp gồm nhiều bước (phương pháp sử dụng nhiều chất phản ứng) được thực hiện trong ít nhất hai bước (bằng cách sử dụng ít nhất hai chất phản ứng), nồng độ của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng trong (các) chất phản ứng có thể được xác định để sau khi trộn

các chất phản ứng ở tỷ lệ trộn đã được xác định trước khi đo chất phân tích, nồng độ của imidazol hoặc hợp chất tương tự trong chất lỏng phản ứng dùng để đo tạo ra sẽ nằm trong khoảng đã nêu ở trên. Trong trường hợp phương pháp có hai bước (phương pháp sử dụng hai chất phản ứng), ví dụ, imidazol hoặc hợp chất tương tự có thể được chứa trong cả hai chất phản ứng thứ nhất và chất phản ứng thứ hai miễn là nồng độ của imidazol hoặc hợp chất tương tự trong chất lỏng phản ứng dùng để đo sau khi trộn các chất phản ứng nằm trong khoảng đã nêu ở trên.

Tiếp xúc

Sự tiếp xúc giữa mẫu chứa chất phân tích và các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích với sự có mặt của imidazol hoặc hợp chất tương tự có thể bị ảnh hưởng đơn giản bằng cách cho imidazol hoặc hợp chất tương tự có mặt trong chất lỏng phản ứng trong đó mẫu được phản ứng với các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích, và thường có thể được thực hiện theo một trong số các cách từ (1) đến (4) dưới đây:

(1) cách trong đó sau khi trộn mẫu và chất đệm chứa imidazol hoặc hợp chất tương tự, hỗn hợp được trộn với chất phản ứng chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích;

(2) cách trong đó mẫu, chất đệm chứa imidazol hoặc hợp chất tương tự, và chất phản ứng chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích được trộn đồng thời;

(3) cách trong đó sau khi trộn mẫu và chất phản ứng chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích, chất đệm chứa imidazol hoặc hợp chất tương tự được bổ sung vào và được trộn với hỗn hợp; và

(4) cách trong đó sau khi trộn chất phản ứng chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích và chất đệm chứa imidazol hoặc hợp chất tương tự, mẫu được bổ sung vào và được trộn với hỗn hợp.

Chất phản ứng dùng để đo

Chất phản ứng dùng để đo theo sáng chế gồm hai hoặc nhiều chất trong số các chất phản ứng cấu thành. Ít nhất một chất phản ứng cấu thành chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích. Chất phản ứng cấu thành là giống như ít nhất một chất phản ứng cấu thành và/hoặc chất phản ứng cấu thành khác biệt với ít nhất một chất phản ứng cấu thành chứa imidazol hoặc hợp chất tương tự. Chất phản ứng dùng để đo theo sáng chế là chất phản ứng dạng lỏng.

Cụ thể, tốt hơn là chất phản ứng dùng để đo theo sáng chế là loại hai chất phản ứng bao gồm chất phản ứng thứ nhất và chất phản ứng thứ hai. Ví dụ, chất phản ứng thứ nhất chứa chất đệm chứa imidazol hoặc hợp chất tương tự, và chất phản ứng thứ hai chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích.

Khi chất phản ứng dùng để đo theo sáng chế là loại ba chất phản ứng bao gồm chất phản ứng thứ nhất, chất phản ứng thứ hai và chất phản ứng thứ ba, theo một ví dụ, chất phản ứng thứ nhất chứa chất đệm để chiết chất phân tích ra khỏi mẫu loãng, chất phản ứng thứ hai chứa chất đệm chứa imidazol, và chất phản ứng thứ ba chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích.

Imidazol hoặc hợp chất tương tự có thể được chứa trong một số hoặc tất cả các chất phản ứng cấu thành miễn là chúng có thể sử dụng tác dụng làm giảm sai số do gây ra bởi mẫu máu ở trạng thái lỏng đã được trộn khi đo, và không ảnh hưởng đến độ ổn định của (các) chất phản ứng cấu thành.

Do đó, trong loại hai chất phản ứng hoặc loại ba chất phản ứng, imidazol hoặc hợp chất tương tự có thể được chứa trong tất cả các chất phản ứng cấu thành hoặc trong tất cả các chất phản ứng cấu thành không chứa các hạt latex.

Nồng độ của imidazol hoặc hợp chất tương tự trong mỗi chất phản ứng cấu thành có thể khác nhau phụ thuộc vào loại chất phản ứng; tuy nhiên, tốt hơn là imidazol hoặc hợp chất tương tự nên được chứa trong mỗi chất phản ứng cấu thành ở nồng độ để có thể điều chỉnh nồng độ cuối cùng của imidazol hoặc hợp chất tương tự không nhỏ hơn 37,5mM và không lớn hơn 375mM ở trạng thái hỗn hợp chất phản

ứng-mẫu khi đo.

Bộ kit chất phản ứng

Bộ kit chất phản ứng theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ nó bao gồm ít nhất các thành phần (1) và (2) dưới đây:

(1) chất phản ứng thứ nhất chứa chất đệm chứa imidazol hoặc hợp chất tương tự; và

(2) chất phản ứng thứ hai chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích.

Nồng độ của imidazol hoặc hợp chất tương tự trong chất đệm có thể khác nhau phụ thuộc vào loại của chất phản ứng; tuy nhiên, imidazol hoặc hợp chất tương tự nên tốt hơn là được chứa trong chất đệm ở nồng độ để có thể điều chỉnh nồng độ cuối cùng của imidazol hoặc hợp chất tương tự không nhỏ hơn 37,5mM và không lớn hơn 375mM ở trạng thái hỗn hợp chất phản ứng-mẫu khi đo. Ví dụ, khi chất phản ứng thứ nhất và chất phản ứng thứ hai được sử dụng ở tỷ lệ 3:1, và mẫu được sử dụng với lượng rất nhỏ, nồng độ của imidazol hoặc hợp chất tương tự trong chất đệm dưới dạng chất phản ứng thứ nhất tốt hơn là không nhỏ hơn 50mM và không lớn hơn 500mM.

Bên cạnh các chất phản ứng dùng để đo ở trên, bộ kit chất phản ứng theo sáng chế có thể bao gồm tờ hướng dẫn, (các) dụng cụ lấy mẫu (pipet lấy mẫu, xy lanh, tấm bông, giấy lọc, v.v.), chất làm loãng mẫu, và chất lỏng chiết mẫu.

Chất làm giảm sai số đo

Chất làm giảm sai số đo theo sáng chế là chất làm giảm sai số đo gây ra bởi mẫu máu trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, và chứa ít nhất imidazol hoặc hợp chất tương tự dùng làm hoạt chất. Chất phản ứng chứa imidazol hoặc hợp chất tương tự trong chất phản ứng dùng để đo đã nêu ở trên có thể được sử dụng làm chất như vậy.

Phương pháp đồng nhất

Như được sử dụng ở đây, phương pháp đồng nhất dùng để chỉ phương pháp đo đặc biệt phát hiện, mà không thực hiện việc tách B/F (liên kết/tự do), phản ứng gây ra bởi chất phân tích xảy ra trong dung dịch đã được trộn (chất lỏng phản ứng) chứa mẫu và chất lỏng chứa chất phản ứng, và tương phản với phương pháp đo không đồng nhất làm sạch và loại bỏ hoàn toàn, bằng thao tác tách B/F, một thành phần phụ không liên quan đến phản ứng đo, và sau đó tiến hành và phát hiện phản ứng chính. Do đó, “thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex được dựa trên phương pháp đồng nhất”, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là trong (các) bước quy trình thông thường từ (1) (3) dưới đây, bước (3) là “bước đo phản ứng ngưng kết giữa chất phân tích và các hạt latex mà không thực hiện bước làm sạch hoặc tách trong hoặc sau bước (2):

(1) bước cho mẫu và imidazol hoặc hợp chất tương tự tiếp xúc với nhau trong pha lỏng;

(2) bước bổ sung các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích vào pha lỏng sau bước (1); và

(3) bước đo phản ứng ngưng kết giữa chất phân tích và các hạt latex sau bước (2).

Các thành phần chất phản ứng khác

Chất phản ứng theo sáng chế có thể chứa polyme như polyetylen glycol, polyvinyl pyrrolidon hoặc polyme phospholipit dưới dạng thành phần để tăng cường sự hình thành của quá trình ngưng kết của các hạt chất mang không tan. Chất phản ứng theo sáng chế có thể còn chứa, dưới dạng thành phần để kiểm soát sự hình thành của quá trình ngưng kết của các hạt chất mang, chất thường được sử dụng như protein, axit amin, sacarit, muối kim loại, chất hoạt động bề mặt, chất khử, chất chaotropic, v.v., có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc ở dạng phối hợp của hai hoặc nhiều chất trong số chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây minh họa sáng chế một cách chi tiết hơn và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thử nghiệm 1

Xác nhận tác dụng làm giảm sai số đo được tạo ra bằng cách bổ sung imidazol theo sáng chế

Sự ảnh hưởng của lipit trong mẫu máu lên sai số đo được xác nhận. Ngoài ra, nghiên cứu được thực hiện về tác dụng của loại chất đệm và việc bổ sung imidazol hoặc hợp chất tương tự lên việc làm giảm sai số đo.

1. Chất phản ứng

(1) Chất phản ứng thứ nhất

Chất phản ứng thứ nhất chứa các thành phần dưới đây (Nồng độ là nồng độ trong chất phản ứng. Cùng một việc áp dụng sau đây.):

- Chất đệm được thể hiện trong bảng 1
- NaCl 500mM
- BSA 1,0%
- Proclin300 0,05%

(2) Chất phản ứng thứ hai

Chất phản ứng thứ hai được điều chế bằng cách trộn hai loại dung dịch hạt latex nhạy kháng thể dưới đây với lượng bằng nhau, và làm loãng hỗn hợp bằng chất đệm MOPS 5mM (pH=7,0) để hệ số hấp phụ ở bước sóng 600nm bằng 5,0Abs.

(i) Dung dịch hạt latex nhạy kháng thể 92212

Dung dịch của các hạt latex có đường kính hạt trung bình 0,3 μ m ở nồng độ 1,0% (chất đệm Tris 5mM (sau đây được gọi là Tris-HCl hoặc đơn giản là Tris) (pH=8,5), lượng bằng nhau của dung dịch kháng thể 92212, được làm loãng đến 0,36mg/ml bằng Tris-HCl 5mM (pH=8,5), được bổ sung, và hỗn hợp được khuấy ở 4°C trong 2 giờ. Sau đó, lượng bằng nhau của Tris-HCl 5mM (pH=8,5) chứa BSA

0,5% được bổ sung, và hỗn hợp được khuấy ở 4°C trong 1 giờ để điều chế dung dịch hạt latex nhạy kháng thể 92212.

(ii) Dung dịch hạt latex nhạy kháng thể 92204R

Bằng cách sử dụng các hạt latex có đường kính hạt trung bình 0,3µm, dung dịch hạt latex nhạy kháng thể 92204R được điều chế theo cùng một cách như được mô tả trong phần (i) ở trên.

2. Mẫu thử nghiệm

Huyết thanh A (huyết thanh hỗn hợp A) được lấy mẫu ngẫu nhiên và được trộn

3. Phương pháp điều chế mẫu

(Nồng độ Intralipos là nồng độ trong mẫu trước khi trộn với các chất phản ứng. Cùng một việc áp dụng sau đây.)

Một phần nhũ tương béo dùng trong tĩnh mạch (Dung dịch truyền Intralipos 10% (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)) đã được trộn với lượng bằng nhau của nước muối sinh lý (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), được bổ sung vào 9 phần mẫu thử nghiệm để điều chế mẫu Intralipos 0,5%.

Một phần nước muối sinh lý được bổ sung vào 9 phần mẫu thử nghiệm để điều chế mẫu Intralipos 0%.

Một phần mẫu Intralipos 0,5% được bổ sung vào 4 phần mẫu thử nghiệm để điều chế mẫu Intralipos 0,1%.

4. Phương pháp đo

Bằng cách sử dụng chất phản ứng thứ nhất phối hợp với chất phản ứng thứ hai, nồng độ của thụ thể interleukin-2 tan trong mẫu chứa nhũ tương béo dùng trong tĩnh mạch được đo bằng thiết bị tự phân tích Hitachi 7180. Cụ thể là, 150µl chất phản ứng thứ nhất được bổ sung vào 5µl mẫu, và hỗn hợp được khuấy ở 37°C trong 5 phút. Sau đó, 50µl chất phản ứng thứ hai được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được khuấy. Sự thay đổi về hệ số hấp phụ kết hợp với sự hình thành của quá

trình ngưng kết được đo ở bước sóng trội 570nm và bước sóng bù 800nm trong 5 phút sau đó. Nồng độ của thụ thể interleukin-2 tan được tính bằng cách áp dụng sự thay đổi đo được về hệ số hấp phụ cho đường cong cân bằng nhận được bằng cách đo chất chuẩn ở các nồng độ đã biết (chung cho các ví dụ thử nghiệm từ 1 đến 3).

Các giá trị đo tương đối với các mẫu Intralipos ở các nồng độ khác nhau được tính bằng cách sử dụng giá trị đo đối với mẫu Intralipos 0% là 100% (chung cho các ví dụ thử nghiệm 1 và 2).

5. Điều kiện đo

Dưới đây là các điều kiện thông số của thiết bị tự phân tích Hitachi 7180:

(1) Lượng chất lỏng: mẫu-chất phản ứng thứ nhất-chất phản ứng thứ hai; 5µl-150µl-50µl

(2) Phương pháp phân tích: phương pháp hai điểm cuối (các điểm đo ánh sáng 19-34)

(3) Bước sóng đo: bước sóng trội 570nm/ bước sóng bù 800nm

(4) Hiệu chỉnh: rãnh then

6. Các kết quả đo

Khi kết quả đo đối với mẫu Intralipos 0,1%, tương ứng với giá trị đo đối với mẫu Intralipos 0% được lấy là 100%, nhỏ hơn 85% hoặc lớn hơn 115%, giá trị này được xác định là bị ảnh hưởng bởi sự cùng tồn tại của Intralipos. Các kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ 1	Ví dụ 2	Ví dụ 3
Mẫu \ Chất đệm	Tris 100mM	HEPES 100mM	Chất đệm imidazol 100mM	Tris 100mM + Chất đệm imidazol 100mM	HEPES 100mM + Chất đệm imidazol 100mM
Mẫu Intralipos 0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Mẫu Intralipos 0,1%	135,1%	152,6%	109,1%	103,7%	105,9%

7. Thảo luận

Khi chỉ Tris hoặc HEPES được sử dụng làm chất đệm trong chất phản ứng thứ nhất, giá trị đo bị ảnh hưởng bởi sự cùng tồn tại của Intralipos. Ngược lại, khi chỉ chất đệm imidazol được sử dụng, hoặc chất đệm imidazol được sử dụng phối hợp với Tris hoặc HEPES, giá trị đo không bị ảnh hưởng bởi sự cùng tồn tại của Intralipos.

Ví dụ thử nghiệm 2

Mối quan hệ giữa nồng độ của imidazol và tác dụng làm giảm sai số đo

Nồng độ của imidazol trong chất lỏng phản ứng ngưng kết miễn dịch được thay đổi để kiểm tra mối quan hệ giữa nồng độ của imidazol và tác dụng làm giảm sai số đo.

1. Chất phản ứng

(1) Chất phản ứng thứ nhất

Cùng một chất phản ứng thứ nhất như chất phản ứng của ví dụ thử nghiệm 1 được sử dụng trừ việc thay thế các chất đệm được thể hiện trong bảng 1 bằng các chất đệm được thể hiện trong bảng 2.

(2) Chất phản ứng thứ hai

Cùng một chất phản ứng thứ hai như chất phản ứng của ví dụ thử nghiệm 1 được sử dụng.

2. Mẫu thử nghiệm

(1) Huyết thanh B (huyết thanh hỗn hợp B) được lấy mẫu ngẫu nhiên và được trộn

(2) Huyết thanh C (huyết thanh hỗn hợp C) được lấy mẫu ngẫu nhiên và được trộn

(3) Huyết thanh D (huyết thanh hỗn hợp D) được lấy mẫu ngẫu nhiên và được trộn

3. Phương pháp điều chế mẫu

Mẫu Intralipos 0,5%, mẫu Intralipos 0% và mẫu Intralipos 0,1% được điều

chế theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 1. Mẫu Intralipos 0,05% được điều chế bằng cách bổ sung một phần mẫu Intralipos 0,5% vào chín phần mẫu thử nghiệm.

4. Phương pháp đo và 5. Điều kiện đo

Giống như phương pháp đo và điều kiện đo của ví dụ thử nghiệm 1.

6. Các kết quả đo

Khi giá trị đo của mẫu Intralipos 0,05% hoặc mẫu Intralipos 0,1%, tương ứng với giá trị đo của mẫu Intralipos 0% được lấy là 100%, không nhỏ hơn 85% và không lớn hơn 115%, giá trị này được xác định là không bị ảnh hưởng (+) bởi sự cùng tồn tại của Intralipos.

+++ cho biết rằng không có sự ảnh hưởng của Intralipos được quan sát thấy đối với huyết thanh bất kỳ trong số các huyết thanh hỗn hợp từ B đến D, ++ cho biết rằng không có sự ảnh hưởng của Intralipos được quan sát thấy đối với hai huyết thanh bất kỳ trong số các huyết thanh hỗn hợp từ B đến D, và + cho biết rằng không có sự ảnh hưởng của Intralipos được quan sát thấy đối với huyết thanh bất kỳ trong số các huyết thanh hỗn hợp từ B đến D. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

	Ví dụ 4	Ví dụ 5	Ví dụ 6
Chất đệm	Chất đệm imidazol 50mM	Chất đệm imidazol 100mM	Chất đệm imidazol 300mM
Mẫu			
Mẫu Intralipos 0%	+++	+++	+++
Mẫu Intralipos 0,05%	+++	+++	+++
Mẫu Intralipos 0,1%	++	+++	+++

7. Thảo luận

Đã phát hiện ra rằng imidazol, khi được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 50mM đến 300mM trong chất đệm imidazol, có thể tránh được sự ảnh hưởng của Intralipos.

Ví dụ thử nghiệm 3: Kiểm tra nguyên nhân của sai số đo

Để xác định có hay không việc sai số đo được gây ra chỉ bởi mẫu máu chứa lipit hoặc bởi chất phản ứng chứa latex, việc kiểm tra được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng không chứa latex dưới dạng chất phản ứng thứ hai.

1. Chất phản ứng

(1) Chất phản ứng thứ nhất

Cùng một chất phản ứng thứ nhất như chất phản ứng của ví dụ thử nghiệm 1 được sử dụng trừ việc thay thế các chất đệm được thể hiện trong bảng 1 bằng Tris 100mM (pH=7,0).

(2) Chất phản ứng thứ hai

Nước muối sinh lý

2. Mẫu thử nghiệm

Cùng một huyết thanh hỗn hợp B, huyết thanh hỗn hợp C và huyết thanh hỗn hợp D như các huyết thanh của ví dụ thử nghiệm 2.

3. Phương pháp điều chế mẫu

Giống như phương pháp điều chế mẫu của ví dụ thử nghiệm 2.

4. Phương pháp đo và 5. Điều kiện đo

Giống như phương pháp đo và điều kiện đo của ví dụ thử nghiệm 1.

6. Các kết quả đo và thảo luận

Hệ số hấp phụ đo được nằm trong khoảng từ 0 đến 1,2mAbs. Không quan sát thấy sự gia tăng về hệ số hấp phụ, phụ thuộc vào nồng độ của Intralipos. Điều này ngụ ý rằng giá trị đo bị ảnh hưởng không bởi độ đục của mẫu máu, gây ra bởi việc bổ sung Intralipos, nhưng bởi sự ngưng kết không đặc hiệu của các hạt latex gây ra bởi sự tiếp xúc với mẫu máu chứa Intralipos.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sáng chế đề xuất phương pháp, trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, có thể làm giảm sai số đo gây ra bởi mẫu máu, và bao gồm bước đưa mẫu máu tiếp xúc với các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích trong pha

lỏng với sự có mặt của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng. Phương pháp theo sáng chế làm cho có thể thực hiện quá trình đo một cách chính xác, bằng thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, ngay cả đối với mẫu giàu lipit, ví dụ từ bệnh nhân bị tăng lipit-huyết.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp đo chất phân tích trong huyết tương nhũ trấp hoặc huyết thanh nhũ trấp bằng thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, phương pháp này bao gồm các bước dưới đây:

(1) cho huyết tương nhũ trấp hoặc huyết thanh nhũ trấp chứa nhũ trấp tiếp xúc với imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng trong pha lỏng;

(2) bổ sung các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích vào pha lỏng tiếp sau bước (1); và

(3) đo phản ứng ngưng kết giữa chất phân tích và các hạt latex sau bước (2), mà không tiến hành bước làm sạch hoặc bước tách trong hoặc sau bước (2),

trong đó nồng độ của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng ở bước (3) đo phản ứng ngưng kết của các hạt latex không nhỏ hơn 100mM và không lớn hơn 375mM.

2. Phương pháp đo chất phân tích trong huyết tương nhũ trấp hoặc huyết thanh nhũ trấp bằng thử nghiệm miễn dịch ngưng kết latex, phương pháp này bao gồm các bước dưới đây:

(1) cho huyết tương nhũ trấp hoặc huyết thanh nhũ trấp tiếp xúc với imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng trong pha lỏng;

(2) bổ sung các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích vào pha lỏng sau bước (1); và

(3) đo phản ứng ngưng kết giữa chất phân tích và các hạt latex sau bước (2), mà không tiến hành bước làm sạch hoặc bước tách trước bước đo (3),

trong đó nồng độ của imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng ở bước (3) đo phản ứng ngưng kết của các hạt latex không nhỏ hơn 100mM và không lớn hơn 375mM.

3. Phương pháp theo điểm 1,

trong đó bước cho huyết tương nhũ trấp hoặc huyết thanh nhũ trấp tiếp xúc

với imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng trong pha lỏng là bước bổ sung chất phản ứng thứ nhất vào huyết tương nhũ trấp hoặc huyết thanh nhũ trấp, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp thứ nhất, trong đó chất phản ứng thứ nhất chứa chất đệm chứa imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng; và

trong đó bước bổ sung các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích vào pha lỏng là bước bổ sung chất phản ứng thứ hai vào hỗn hợp thứ nhất, trong đó chất phản ứng thứ hai này chứa các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó chất phản ứng thứ nhất là chất đệm chứa imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó chất phản ứng thứ hai là huyền phù của các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó bước đo phản ứng ngưng kết giữa chất phân tích và các hạt latex là bước đo phản ứng ngưng kết giữa chất phân tích và các hạt latex mà không tiến hành bước làm sạch hoặc bước tách trong hoặc sau bước bổ sung huyền phù của các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích vào hỗn hợp thứ nhất.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng được chọn từ nhóm bao gồm imidazol, 1-metylimidazol, 1-etylimidazol, 1-propylimidazol, 1-butyylimidazol, 1-phenylimidazol, 1-vinyylimidazol, 1-alylimidazol, 1-benzyl-2-metylimidazol, 1-benzyl-2-formylimidazol, 1-benzyl-4-hydroxymetylimidazol, 1-benzyl-5-hydroxymetylimidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-imidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-2-metylimidazol, 2-metyimidazol, 2-etylimidazol, 2-propylimidazol, 2-butyylimidazol, 2-phenylimidazol, 2-formylimidazol, 2-hydroxymetylimidazol, 2-metyl-1-vinyylimidazol, 2-butyl-4-formylimidazol, 2-butyl-4-hydroxymetylimidazol, 2-butyl-4-chloro-5-formylimidazol, 2-hydroxymetyl-1-benzylimidazol,

2-hydroxymetyl-2-metylimidazol, 2-etyl-4-metylimidazol, 4-butyylimidazol, 4-formylimidazol, 4-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-1-tritylimidazol, 5-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-5-metylimidazol, 4-hydroxymetylimidazol hydroclorua, metylimidazol-4-carboxylat, etylimidazol-4-carboxylat, 1,2-dimetylimidazol, 1,2,4-trimetylimidazol và muối của bất kỳ trong số imidazol hoặc dẫn xuất imidazol nói trên.

8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng được chọn từ nhóm bao gồm imidazol, 1-metylimidazol, 1-etylimidazol, 1-propylimidazol, 1-butyylimidazol, 1-phenylimidazol, 1-vinyylimidazol, 1-alylimidazol, 1-benzyl-2-metylimidazol, 1-benzyl-2-formylimidazol, 1-benzyl-4-hydroxymetylimidazol, 1-benzyl-5-hydroxymetylimidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-imidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-2-metylimidazol, 2-metyimidazol, 2-etylimidazol, 2-propylimidazol, 2-butyylimidazol, 2-phenylimidazol, 2-formylimidazol, 2-hydroxymetylimidazol, 2-metyl-1-vinyylimidazol, 2-butyl-4-formylimidazol, 2-butyl-4-hydroxymetylimidazol, 2-butyl-4-chloro-5-formylimidazol, 2-hydroxymetyl-1-benzylimidazol, 2-hydroxymetyl-2-metylimidazol, 2-etyl-4-metylimidazol, 4-butyylimidazol, 4-formylimidazol, 4-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-1-tritylimidazol, 5-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-5-metylimidazol, 4-hydroxymetylimidazol hydroclorua, metylimidazol-4-carboxylat, etylimidazol-4-carboxylat, 1,2-dimetylimidazol, 1,2,4-trimetylimidazol và muối của bất kỳ trong số imidazol hoặc dẫn xuất imidazol nói trên.

9. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bước (1) bao gồm cho huyết tương nhũ trấp hoặc huyết thanh nhũ trấp tiếp xúc với chất đệm chứa imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó các hạt latex được bổ sung dưới dạng huyền phù của các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó bước đo phản ứng ngưng kết giữa chất phân tích và các hạt latex là bước đo phản ứng ngưng kết giữa chất phân tích và các hạt latex mà không tiến hành bước làm sạch hoặc bước tách trong hoặc sau bước bổ sung huyền phù của các hạt latex mang chất có ái lực đặc hiệu đối với chất phân tích vào hỗn hợp thứ nhất.

12. Phương pháp theo điểm 2, trong đó imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng được chọn từ nhóm bao gồm imidazol, 1-metylimidazol, 1-etylimidazol, 1-propylimidazol, 1-butyylimidazol, 1-phenylimidazol, 1-vinylimidazol, 1-alylimidazol, 1-benzyl-2-metylimidazol, 1-benzyl-2-formylimidazol, 1-benzyl-4-hydroxymetylimidazol, 1-benzyl-5-hydroxymetylimidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-imidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-2-metylimidazol, 2-metyimidazol, 2-etylimidazol, 2-propylimidazol, 2-butyylimidazol, 2-phenylimidazol, 2-formylimidazol, 2-hydroxymetylimidazol, 2-metyl-1-vinylimidazol, 2-butyl-4-formylimidazol, 2-butyl-4-hydroxymetylimidazol, 2-butyl-4-chloro-5-formylimidazol, 2-hydroxymetyl-1-benzylimidazol, 2-hydroxymetyl-2-metylimidazol, 2-etyl-4-metylimidazol, 4-butyylimidazol, 4-formylimidazol, 4-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-1-tritylimidazol, 5-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-5-metylimidazol, 4-hydroxymetylimidazol hydroclorua, metylimidazol-4-carboxylat, etylimidazol-4-carboxylat, 1,2-dimetylimidazol, 1,2,4-trimetylimidazol và muối của bất kỳ trong số imidazol hoặc dẫn xuất imidazol nói trên.

13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó imidazol hoặc dẫn xuất imidazol, hoặc muối của chúng được chọn từ nhóm bao gồm imidazol, 1-metylimidazol, 1-etylimidazol, 1-propylimidazol, 1-butyylimidazol, 1-phenylimidazol, 1-vinylimidazol, 1-alylimidazol, 1-benzyl-2-metylimidazol, 1-benzyl-2-formylimidazol, 1-benzyl-4-hydroxymetylimidazol, 1-benzyl-5-hydroxymetylimidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-imidazol, 1-(2-hydroxyetyl)-2-metylimidazol, 2-metyimidazol,

2-ethylimidazol, 2-propylimidazol, 2-butylimidazol, 2-phenylimidazol,
 2-formylimidazol, 2-hydroxymetylimidazol, 2-metyl-1-vinylimidazol,
 2-butyl-4-formylimidazol, 2-butyl-4-hydroxymetylimidazol,
 2-butyl-4-chloro-5-formylimidazol, 2-hydroxymetyl-1-benzylimidazol,
 2-hydroxymetyl-2-metylimidazol, 2-etyl-4-metylimidazol, 4-butylimidazol,
 4-formylimidazol, 4-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-1-tritylimidazol,
 5-formyl-1-metylimidazol, 4-formyl-5-metylimidazol, 4-hydroxymetylimidazol
 hydroclorua, metylimidazol-4-carboxylat, etylimidazol-4-carboxylat,
 1,2-dimetylimidazol, 1,2,4-trimetylimidazol và muối của bất kỳ trong số imidazol
 hoặc dẫn xuất imidazol nói trên.