



(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)



1-0043579

(51)^{2020.01} C12Q 1/6886; C12Q 1/686

(13) B

(21) 1-2020-04632

(22) 11/01/2019

(86) PCT/US2019/013241 11/01/2019

(87) WO 2019/140226 18/07/2019

(30) 62/617,079 12/01/2018 US; 62/718,290 13/08/2018 US

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/03/2021 396A

(73) GRAIL, INC. (US)

1525 O'Brien Drive, Menlo Park, California 94025, United States of America

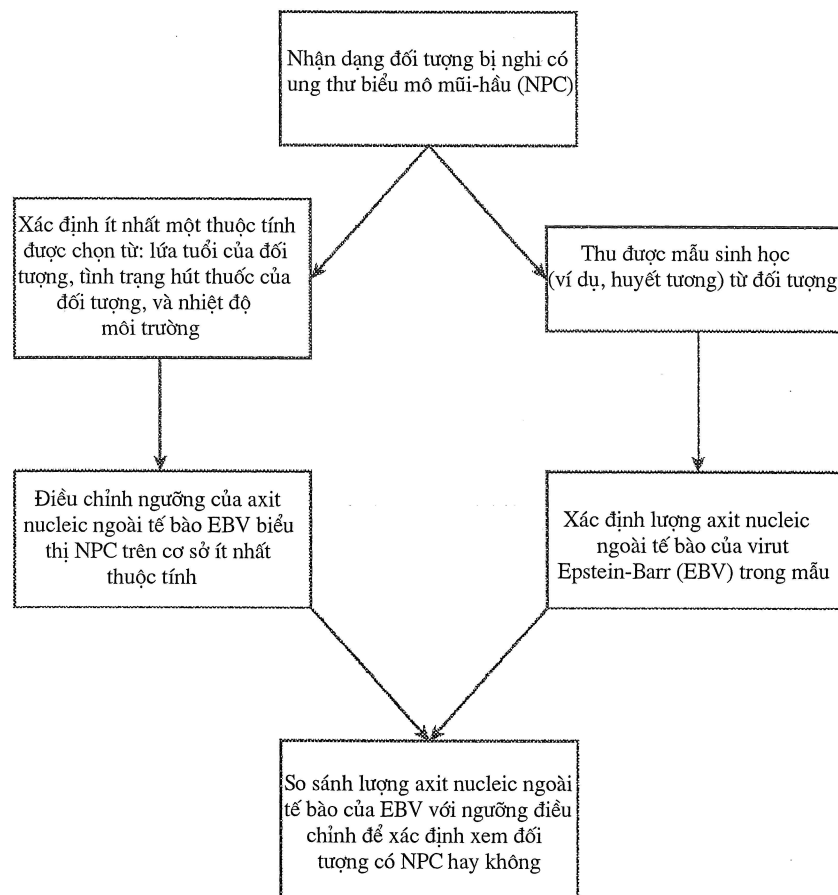
(72) Yuk-Ming Dennis LO (GB); Kwan Chee CHAN (CN); Weng In CHU (CN).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH MẪU, SẢN PHẨM MÁY TÍNH VÀ HỆ THỐNG
BAO GỒM SẢN PHẨM MÁY TÍNH

(21) 1-2020-04632

(57) Sáng chế đề xuất các phương pháp, các hệ thống, và vật ghi đọc được bằng máy tính nhằm phát hiện axit nucleic từ nguồn gây bệnh, ví dụ, virus, ví dụ, virus Epstein-Barr (EBV), mẫu nucleic ngoài tế bào từ cá thể có nguy cơ, ví dụ, ung thư biểu mô mũi hầu (NPC). Các phương pháp, các hệ thống, và vật ghi đọc được bằng máy tính có thể được dùng để sàng lọc sự có mặt của tình trạng, ví dụ, NPC, bằng cách sử dụng ngưỡng đã được điều chỉnh dựa trên các thuộc tính của mẫu.



Hình 4

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

[001] Sáng chế này liên quan đến phương pháp sàng lọc sự có mặt của khối u ở đối tượng dựa trên phân tích axit nucleic của nguồn bệnh như virus. Sáng chế còn liên quan đến sản phẩm máy tính bao gồm vật ghi đọc được bằng máy tính, và hệ thống bao gồm sản phẩm máy tính để sàng lọc tình trạng như ung thư biểu mô mũi hầu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

[002] Ung thư biểu mô mũi-hầu (nasopharyngeal carcinoma - NPC) là một trong số các dạng ung thư phổ biến nhất ở miền Nam Trung Quốc và Đông Nam Á (Tang *et al. Cancer Lett* 2016;374:22-30). Sinh bệnh học của NPC có thể liên quan chặt chẽ với hiện tượng nhiễm virus Epstein-Barr (EBV). Ở các vùng dịch bệnh, hệ gen EBV có thể được phát hiện ở các tế bào ung thư NPC ở hầu hết các bệnh nhân. Sự tuần hoàn của ADN của EBV không chứa tế bào trong huyết tương có thể là dấu sinh học cho NPC (Lo *et al. Cancer Res* 1999; 59:1188-91). Phân tích ADN của EBV trong huyết tương có thể là hữu ích để phát hiện, theo dõi và báo trước về NPC.

[003] Tuy nhiên, lượng ADN ngoài tế bào (cfDNA) của EBV ở mẫu có thể thay đổi tùy theo các yếu tố phụ thuộc vào đối tượng (ví dụ, thói quen hút thuốc hiện tại) và các yếu tố độc lập với đối tượng (ví dụ, nhiệt độ môi trường). Cần có các phương pháp, các hệ thống, và vật ghi đọc được bằng máy tính cải tiến mà có thể giải thích cho các yếu tố mà ảnh hưởng đến nồng độ ADN ngoài tế bào EBV, và có thể tích hợp thông tin này vào sàng lọc NPC để làm giảm tỷ lệ dương tính giả khi phát hiện NPC.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

[004] Mục đích của sáng chế nhằm đề xuất phương pháp sàng lọc sự có mặt của khối u ở đối tượng, các phương pháp bao gồm: a) xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus trong mẫu sinh học từ đối tượng; b) xác định ngưỡng của axit nucleic ngoài tế bào trên cơ sở thuộc tính được chọn từ nhóm bao gồm: lứa tuổi của đối tượng, tình trạng hút thuốc của đối tượng, và nhiệt độ môi trường; và c) so sánh lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus với ngưỡng, nhờ đó sàng lọc đối tượng có khối u.

[005] Ngưỡng có thể được xác định trên cơ sở tình trạng hút thuốc của đối tượng. Nếu tình trạng hút thuốc của đối tượng là người hút thuốc, ngưỡng có thể được thiết lập cao hơn nếu tình trạng hút thuốc của đối tượng không là người hút. Ngưỡng có thể được xác định trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng. Ngưỡng có thể chứa mối tương quan thuận với lứa tuổi của đối tượng.

Ngưỡng có thể được xác định trên cơ sở nhiệt độ môi trường. Ngưỡng có thể tương quan nghịch với nhiệt độ môi trường. Nhiệt độ môi trường có thể là nhiệt độ đo được ở vị trí trong phạm vi 50km từ vị trí mà tại đó mẫu được lấy từ đối tượng. Nhiệt độ môi trường có thể là nhiệt độ môi trường trung bình vào ngày mẫu được lấy từ đối tượng. Ngưỡng có thể được xác định trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng và tình trạng hút thuốc của đối tượng. Ngưỡng có thể được xác định trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng và nhiệt độ môi trường. Ngưỡng có thể được xác định trên cơ sở tình trạng hút thuốc của đối tượng và nhiệt độ môi trường. Ngưỡng có thể được xác định trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng, tình trạng hút thuốc của đối tượng, và nhiệt độ môi trường. Theo một số phương án, ngưỡng không được xác định trên cơ sở liệu đối tượng có mắc bệnh đái tháo đường, dùng rượu, tập thể dục, mắc chứng tăng huyết áp, bị tăng mỡ máu, hoặc mắc bệnh tim thiếu máu cục bộ hay không.

[006] So sánh lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus với ngưỡng trên cơ sở thuộc tính có thể làm giảm tỷ lệ dương tính giả của sàng lọc so với so sánh lượng axit nucleic ngoài tế bào với ngưỡng không trên cơ sở thuộc tính. Lượng có thể chứa nhiều bản sao của axit nucleic ngoài tế bào từ virus trong mỗi mililit (số bản sao/ml). Các phương pháp còn có thể bao gồm thực hiện sàng lọc thứ hai về sự có mặt của khối u nếu lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus ở mẫu sinh học này cao hơn ngưỡng. Sàng lọc thứ hai có thể bao gồm việc xác định kích cỡ của axit nucleic ngoài tế bào từ virus ở mẫu sinh học thứ hai. Mẫu sinh học thứ hai có thể là đồng nhất với mẫu sinh học. Mẫu sinh học thứ hai có thể là khác mẫu sinh học. Sàng lọc thứ hai có thể bao gồm việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ mẫu sinh học thứ hai từ đối tượng mà từ đó virus và có kích cỡ trong khoảng nhất định. Việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus và có kích cỡ trong khoảng nhất định có thể bao gồm việc giải trình tự song song với số lượng lớn axit nucleic ngoài tế bào ở mẫu sinh học thứ hai để tạo ra kết quả đọc trình tự.

[007] Mẫu sinh học có thể chứa huyết tương hoặc huyết thanh. Việc xác định lượng có thể bao gồm việc khuếch đại axit nucleic ngoài tế bào. Việc khuếch đại có thể bao gồm phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). PCR có thể bao gồm PCR định lượng (qPCR). Khối u có thể là ung thư mũi hầu. Virus có thể là virus Epstein-Barr (EBV). Phương pháp còn có thể bao gồm việc điều trị khối u cho đối tượng nếu sàng lọc cho thấy đối tượng có khối u.

[008] Các sản phẩm máy tính cũng được được bộc lộ dưới đây trong bản mô tả này, bao gồm vật ghi đọc được bằng máy tính chứa nhiều lệnh để kiểm soát hệ thống máy tính để thực hiện các thao tác của bất kỳ trong số phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này.

[009] Ngoài ra, các hệ thống gồm sản phẩm bất kỳ trong số các sản phẩm máy tính được bộc lộ trong bản mô tả này và một hoặc nhiều bộ xử lý để thực hiện các lệnh lưu trên vật ghi đọc được bằng máy tính được bộc lộ trong bản mô tả này.

Kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn

[0010] Mọi tài liệu công bố, patent, và đơn yêu cầu cấp patent được nêu trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn ở mức độ như từng tài liệu công bố, patent, hoặc đơn yêu cầu cấp patent được nêu rõ và cụ thể là được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

[0011] Các dấu hiệu mới của sáng chế được nêu dưới đây, trong đó tính đặc thù được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Hiểu biết tốt hơn về các dấu hiệu và các ưu điểm theo sáng chế thu được bằng cách tham khảo phần mô tả chi tiết dưới đây mà thể hiện các phương án minh họa, trong đó các nguyên lý của sáng chế được áp dụng, và các hình vẽ kèm theo bao gồm:

[0012] **Hình 1** minh họa mối tương quan giữa lứa tuổi và mức độ phát hiện của ADN của virus Epstein-Barr (EBV) trong huyết tương ở đối tượng không mắc NPC.

[0013] **Hình 2** minh họa mối tương quan giữa nhiệt độ môi trường trung bình vào ngày thứ của sàng lọc và mức độ phát hiện của ADN của EBV trong huyết tương ở đối tượng không mắc NPC.

[0014] **Hình 3** minh họa hệ thống máy tính mà được lập trình hoặc được tạo cấu hình theo cách khác để thực thi các phương pháp theo sáng chế.

[0015] **Hình 4** là biểu đồ minh họa tiến trình của phương pháp phát hiện NPC trên cơ sở lượng axit nucleic ngoài tế bào của EBV phát hiện được từ mẫu.

[0016] **Hình 5** là biểu đồ thể hiện tiến trình của phương pháp làm ví dụ theo sáng chế chứa thực hiện thử nghiệm qPCR thứ nhất, và có tiềm năng thực hiện thử nghiệm thứ hai trên cơ sở giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS).

Mô tả chi tiết sáng chế**[0017] Tổng quan**

[0018] Sáng chế đề xuất các phương pháp, các hệ thống, và vật ghi đọc được bằng máy tính để sàng lọc về sự có mặt của khối u, ví dụ, ung thư mũi hầu, bao gồm việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào, ví dụ, ADN, từ virus, ví dụ, virus Epstein Barr (EBV) ở mẫu sinh học, ví dụ, huyết tương, từ một đối tượng, xác định ngưỡng của axit nucleic ngoài tế bào trên cơ sở thuộc tính được chọn từ nhóm bao gồm lứa tuổi của đối tượng, tình trạng hút thuốc của đối tượng, và nhiệt độ môi trường; và so sánh lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus với ngưỡng, theo cách đó sàng lọc đối tượng có khối u.

[0019] Phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể xác định hoặc điều chỉnh ngưỡng của axit nucleic ngoài tế bào trên cơ sở một hoặc nhiều thuộc tính. xác định hoặc điều chỉnh ngưỡng trên cơ sở một hoặc nhiều thuộc tính, trong bản mô tả này còn được gọi là các dấu hiệu,

có thể làm giảm tỷ lệ dương tính giả của sàng lọc so với việc không xác định hoặc điều chỉnh ngưỡng trên cơ sở một hoặc nhiều thuộc tính. Dương tính giả có thể chỉ đối tượng mà không mắc tình trạng (ví dụ, khối u), nhưng được xác định mắc tình trạng bằng cách sàng lọc hoặc phương pháp theo sáng chế hoặc thử nghiệm khác.

[0020] Xác định ngưỡng

[0021] Theo các phương pháp, các hệ thống, và vật ghi đọc được bằng máy tính theo sáng chế, ngưỡng có thể là lượng axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus là dấu hiệu chỉ báo về khối u hoặc nguy cơ khối u ở đối tượng. Ngưỡng có thể được xác định, một phần, như được bộc lộ trong công bố đơn PCT số WO2018081130 hoặc công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20180237863, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Ngưỡng có thể được xác định theo phân tích bộ luyện bao gồm bộ mẫu sinh học từ một hoặc nhiều đối tượng đã biết có khối u, ví dụ, ung thư mũi hầu, và bộ mẫu sinh học từ một hoặc nhiều đối tượng đã biết không có khối u, ví dụ, ung thư mũi hầu. Ngưỡng có thể được thiết lập sao cho 100%, ít nhất là 99%, ít nhất là 95%, ít nhất là 90%, ít nhất là 85%, ít nhất là 80%, ít nhất là 75%, ít nhất là 70%, ít nhất là 65%, ít nhất là 60%, ít nhất là 55%, hoặc ít nhất là 50% mẫu sinh học từ đối tượng đã biết là có khối u, ví dụ, ung thư mũi hầu, có lượng axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus (ví dụ, EBV) cao hơn ngưỡng. Ngưỡng cơ bản có thể được thiết lập, và ngưỡng cơ bản có thể được điều chỉnh trên cơ sở thuộc tính được chọn từ nhóm bao gồm lứa tuổi của đối tượng, tình trạng hút thuốc của đối tượng, và nhiệt độ môi trường.

[0022] Ngưỡng có thể là lượng axit nucleic ngoài tế bào. Lượng axit nucleic ngoài tế bào có thể là lượng axit nucleic (ví dụ, axit nucleic của virus, axit nucleic của EBV) đã được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20180237863. Ví dụ, ngưỡng có thể là lượng huyết tương ADN của EBV, như nồng độ ADN của EBV trong huyết tương. Lượng có thể được xác định từ mẫu. Axit nucleic ngoài tế bào có thể axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus. Lượng axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus có thể chỉ báo lượng virus của mẫu. Lượng axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus có thể là dấu hiệu chỉ báo về khối u hoặc nguy cơ khối u ở đối tượng. Lượng axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus có thể là lượng biểu thị có khối u.

[0023] Lượng có thể là số bản sao của axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus trong mỗi đơn vị thể tích (ví dụ, mililit (số bản sao/ml)), số bản sao của trình tự của axit nucleic cụ thể ngoài tế bào có nguồn gốc virus trong mỗi đơn vị thể tích (ví dụ, mililit), tổng tỷ phần axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus so với tổng axit nucleic ngoài tế bào không có nguồn gốc virus, hoặc tỷ phần trình tự của axit nucleic cụ thể ngoài tế bào có nguồn gốc virus so với tổng axit nucleic ngoài tế bào không có nguồn gốc virus. Lượng axit nucleic ngoài tế bào có thể là lượng,

khối lượng (ví dụ, gam, nanogam), số phân tử (ví dụ, 1, 2, 3, 4), mức độ, lượng đã được chuẩn hóa, nồng độ (ví dụ, bản sao/ml), tỷ lệ phần trăm, hoặc tỷ lệ của axit nucleic ngoài tế bào. Lượng axit nucleic ngoài tế bào có thể, ví dụ, là tỷ lệ giữa axit nucleic của virus ngoài tế bào so với axit nucleic không của virus ngoài tế bào ở mẫu, tỷ lệ giữa axit nucleic của virus ngoài tế bào trong khoảng nhất định so với axit nucleic không của virus ngoài tế bào có tỷ lệ kích cỡ giống nhau hoặc khác nhau ở mẫu này. Các ví dụ về tỷ lệ kích cỡ có thể được tìm thấy, ví dụ, trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20180237863.

[0024] Lượng có thể là tỷ phần axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus ở mẫu. Tỷ phần của axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus có thể là tỷ phần ADN ngoài tế bào có nguồn gốc virus trong một khoảng kích cỡ. Tỷ phần có thể được dùng để xác định tỷ lệ kích cỡ của axit nucleic ngoài tế bào. Tỷ lệ kích cỡ có thể là tỷ phần axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus trong khoảng kích cỡ so với tỷ phần axit nucleic nhiễm sắc thể thường ngoài tế bào trong khoảng kích cỡ. Theo một ví dụ, tỷ lệ kích cỡ ADN của EBV là tỷ phần của ADN của EBV với kích cỡ nằm trong khoảng từ 80 đến 110 cặp bazơ so với tỷ phần của ADN của nhiễm sắc thể thường ngoài tế bào với kích cỡ nằm trong khoảng từ 80 đến 110 cặp bazơ. Ví dụ khác, tỷ lệ kích cỡ ADN của EBV là tỷ phần của ADN của EBV ít hơn 180 cặp bazơ so với tỷ phần của ADN của nhiễm sắc thể thường ngoài tế bào ít hơn 180 cặp bazơ. Theo một ví dụ, tỷ lệ kích cỡ ADN của EBV là tỷ phần của ADN của EBV ít hơn 150 cặp bazơ so với tỷ phần của ADN của nhiễm sắc thể thường ngoài tế bào ít hơn 150 cặp bazơ.

[0025] Trình tự cụ thể có nguồn gốc virus có thể là trình tự mã hóa protein ẩn ở màng (LMP), kháng nguyên của nhân virus Epstein-Barr (EBNA), virus Epstein-Barr mã hóa ARN nhỏ (EBER), polymeraza của EBV (Pol), protein phụ của polymeraza của EBV; đoạn BamHI, hoặc tổ hợp của chúng.

[0026] Ngưỡng có thể là khoảng 1 bản sao/ml, 5 bản sao/ml, 10 bản sao/ml, 50 bản sao/ml, 100 bản sao/ml, 200 bản sao/ml, 300 bản sao/ml, 500 bản sao/ml, 1000 bản sao/ml, 10.000 bản sao/ml, hoặc 100.000 bản sao/ml. Ngưỡng có thể từ 0 đến 4000 bản sao/ml. Ngưỡng có thể là ít nhất là 50 bản sao/ml. Ngưỡng có thể từ 50 đến 500 bản sao/ml. Ngưỡng có thể từ 100 đến 500 bản sao/ml. Ngưỡng có thể từ 200 đến 500 bản sao/ml. Ngưỡng có thể từ 50 đến 200 bản sao/ml. Ngưỡng có thể đến 500 bản sao/ml. Theo cách khác, ngưỡng có thể là từ 20.000 đến 50.000 bản sao/ml.

[0027] Trong một số trường hợp, ngưỡng có thể là mức cơ bản đã được điều chỉnh, hoặc ngưỡng ban đầu, trong đó ngưỡng cơ bản đã định trước được điều chỉnh trên cơ sở một hoặc nhiều thuộc tính phụ thuộc hoặc không phụ thuộc vào đối tượng. Theo một ví dụ, ngưỡng cơ bản được điều chỉnh trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng, tình trạng hút thuốc của đối tượng, nhiệt độ

mà ở nhiệt độ đó mẫu được gom, hoặc tổ hợp của chúng. Trong một số trường hợp, ngưỡng có thể được xác định trên cơ sở ít nhất là một thuộc tính phụ thuộc hoặc không phụ thuộc vào đối tượng, ví dụ, bằng cách áp dụng thuật toán.

[0028] Thuộc tính có thể là thuộc tính phụ thuộc vào đối tượng hoặc thuộc tính không phụ thuộc vào đối tượng. Các ví dụ về các thuộc tính phụ thuộc vào đối tượng bao gồm lứa tuổi, tình trạng hút thuốc hiện tại, tình trạng dùng đồ uống có cồn hiện tại, thói quen tập thể dục, và tình trạng bệnh mắc đồng thời. Ví dụ về thuộc tính không phụ thuộc vào đối tượng bao gồm nhiệt độ môi trường.

[0029] Trong một số trường hợp, ngưỡng được xác định trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng. Trong một số trường hợp, ngưỡng của nồng độ ADN của EBV trong huyết tương được xác định trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng. Ví dụ, giới hạn dưới (ngưỡng) có thể được sử dụng cho người trẻ hơn là cho người cao tuổi. Ví dụ khác, giới hạn trên (ngưỡng) có thể được sử dụng cho người cao tuổi hơn là cho người trẻ. Lứa tuổi của đối tượng có thể là lứa tuổi của đối tượng tại thời điểm mẫu sinh học này được gom. Lứa tuổi của đối tượng có thể, ví dụ, là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, hoặc 120 tuổi. Lứa tuổi của đối tượng có thể là 12 tuổi hoặc ít tuổi hơn, 13 tuổi đến 19 tuổi, 20 tuổi đến 35 tuổi, 36 tuổi đến 45 tuổi, 46 tuổi đến 59 tuổi, 60 tuổi đến 79 tuổi, hoặc trên 80 tuổi. Ngưỡng có thể chứa điều chỉnh dương với lứa tuổi (ví dụ, xem: **Hình 1**). Trong một số trường hợp, đối tượng cao tuổi hơn (ví dụ, đối tượng cao tuổi hơn không mắc NPC) có thể có lượng cao ADN ngoài tế bào từ EBV ở mẫu sinh học hơn đối tượng ít tuổi hơn (ví dụ, đối tượng ít tuổi hơn không mắc NPC). Ví dụ, mức tăng 5 năm tuổi có thể liên quan đến mức tăng 0,6% về mức độ dương của ADN của EBV trong huyết tương trong số các đối tượng không mắc NPC (ví dụ, xem: **Hình 1**). Trong một số trường hợp, lứa tuổi của đối tượng được so sánh với lứa tuổi cơ bản. Lứa tuổi cơ bản có thể là lứa tuổi đã được định trước mà từ đó điều chỉnh bất kỳ tiếp theo được thực hiện. Trong một số trường hợp, nếu lứa tuổi của đối tượng cao hơn lứa tuổi cơ bản, thì ngưỡng được tăng ít nhất là khoảng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, hoặc 10% cho mỗi năm tuổi của đối tượng cao hơn lứa tuổi cơ bản. Trong một số trường hợp, nếu lứa tuổi của đối tượng là thấp hơn lứa tuổi gốc, thì ngưỡng được giảm ít nhất là khoảng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, hoặc 10% cho mỗi năm tuổi của đối tượng thấp hơn lứa tuổi gốc. Trong một số trường hợp, nếu lứa tuổi của đối tượng cao hơn lứa tuổi cơ bản, thì ngưỡng được tăng ít nhất là khoảng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, hoặc 10% đối với từng khoảng 5 hoặc 10 năm

tuổi của đối tượng cao hơn lứa tuổi cơ bản. Ví dụ, nếu lứa tuổi cơ bản là 50, lứa tuổi của đối tượng là 62, và ngưỡng được tăng 2% cho từng khoảng 5 năm, thì ngưỡng cho đối tượng có thể được tăng 6% so với ngưỡng ở lứa tuổi 50. Trong một số trường hợp, nếu lứa tuổi của đối tượng là thấp hơn lứa tuổi gốc, thì ngưỡng được giảm ít nhất là khoảng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, hoặc 10% đối với từng khoảng 5 hoặc 10 năm tuổi của đối tượng thấp hơn lứa tuổi gốc.

[0030] Trong một số trường hợp, ngưỡng được xác định trên cơ sở tình trạng hút thuốc của đối tượng. Trong một số trường hợp, ngưỡng của nồng độ ADN của EBV trong huyết tương được xác định trên cơ sở tình trạng hút thuốc của đối tượng. Tình trạng hút thuốc của đối tượng có thể là người hút thuốc hoặc người không hút thuốc. Nếu đối tượng là người hút thuốc, thì ngưỡng có thể được thiết lập cao hơn so với khi đối tượng không là người hút. Trong một số trường hợp, tình trạng hút thuốc biểu thị liệu đối tượng hiện là người hút thuốc hoặc hiện không là người hút thuốc. Người hiện hút thuốc có thể là đối tượng mà đã tham gia hút thuốc (ví dụ, đã hút ít nhất là một, 10, hoặc 100 điếu thuốc lá) trong ngày, tuần, tháng, hoặc năm trước. Hút thuốc có thể là hút thuốc lá hoặc sản phẩm cần sa bất kỳ. Thuốc lá hoặc sản phẩm cần sa có thể, ví dụ, là xì gà điếu, tấm/ống thuốc lá cuộn, điếu thuốc lá nhỏ hở hai đầu, điếu xì gà nhỏ, điếu thuốc lá, hoặc thuốc lá trộn thảo dược có nguồn gốc từ Indônexia. Việc hút thuốc có thể được tạo điều kiện thuận lợi bởi thiết bị điện tử cầm tay, như điếu thuốc lá điện tử. Thiết bị điện tử có thể tạo ra sol khí, hoặc hơi, chứa nicotin. Trong một số trường hợp, người hiện đang hút thuốc hoặc đã từng hút thuốc hút trung bình khoảng 1, khoảng 5, khoảng 10, khoảng 15, khoảng 20, khoảng 25, khoảng 30, khoảng 35, khoảng 40, khoảng 45, khoảng 50, khoảng 55, khoảng 60, khoảng 65, khoảng 70, hoặc khoảng 75 điếu thuốc lá mỗi ngày. Trong một số trường hợp, người hiện đang hút thuốc/đã từng hút thuốc hút khoảng từ 1 đến 10, khoảng 10 đến 20, khoảng 20 đến 30, khoảng 30 đến 40, khoảng 40 đến 50, khoảng 50 đến 60, hoặc khoảng 60 đến 75 điếu thuốc lá mỗi ngày. Trong một số trường hợp, người hiện đang hút thuốc hoặc đã từng hút thuốc hút nhiều hơn 75 điếu thuốc lá mỗi ngày. Trong một số trường hợp, nếu đối tượng là người hút thuốc lá, thì ngưỡng được tăng ít nhất là khoảng 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, hoặc 25%. Trong một số trường hợp, nếu đối tượng là người không hút thuốc, thì ngưỡng được giảm ít nhất là khoảng 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, hoặc 25%. Người không hút thuốc có thể là đối tượng mà không tham gia vào việc hút thuốc (ví dụ, đã hút ít nhất là một, 10, hoặc 100 điếu thuốc lá) trong ngày, tuần, tháng, hoặc năm trước.

[0031] Trong một số trường hợp, ngưỡng được xác định trên cơ sở nhiệt độ môi trường. Trong một số trường hợp, ngưỡng nồng độ ADN của EBV trong huyết tương được xác định trên cơ sở nhiệt độ môi trường. Ví dụ, ngưỡng cao hơn có thể được sử dụng cho các mẫu được gom vào ngày lạnh hơn so với ngưỡng được sử dụng cho các mẫu được gom vào ngày ấm hơn. Ví dụ

khác, ngưỡng thấp hơn có thể được sử dụng cho các mẫu được gom vào ngày ấm hơn so với ngưỡng được sử dụng cho các mẫu được gom vào ngày lạnh hơn. Nhiệt độ môi trường có thể là nhiệt độ tại thời điểm mẫu sinh học này được lấy từ đối tượng. Nhiệt độ môi trường có thể được xác định ở địa điểm tại hoặc gần nơi mẫu được gom. Địa điểm gần nơi mẫu được gom có thể là địa điểm trong phạm vi 1 kilomet (km), 10 km, 100 km, 200 km, 300 km, 400 km, hoặc 500 km từ địa điểm nơi mẫu được lấy. Nhiệt độ môi trường có thể là nhiệt độ của môi trường, tại hoặc gần địa điểm nơi mẫu được lấy, vào ngày mẫu được gom. Nhiệt độ môi trường có thể là nhiệt độ môi trường trung bình. Nhiệt độ môi trường trung bình có thể là nhiệt độ môi trường trung bình vào ngày mẫu được gom, nhiệt độ môi trường trung bình suốt 24 giờ ngay trước thời điểm mẫu được gom, hoặc nhiệt độ môi trường trung bình trong tuần ngay trước thời điểm mẫu được gom. Nhiệt độ môi trường có thể là nhiệt độ cao hoặc nhiệt độ thấp ở địa điểm tại hoặc gần nơi mẫu được gom vào ngày mẫu được gom. Nhiệt độ môi trường có thể là nhiệt độ ở địa điểm tại hoặc gần nơi mẫu được gom vào ngày mẫu được gom tại thời điểm cụ thể trong ngày (ví dụ, buổi sáng, buổi trưa, buổi chiều, buổi tối). Nhiệt độ môi trường có thể được xác định tại đài quan sát thời tiết chính thức ở đô thị hoặc quốc gia nơi mẫu được lấy. Nhiệt độ môi trường có thể được xác định bởi Cơ quan Dự báo Thời tiết Quốc gia của Mỹ (U.S. National Weather Service) hoặc đài quan sát Hong Kong (Hong Kong Observatory). Nhiệt độ môi trường có thể được xác định bằng cách sử dụng nhiệt kế tương tự hoặc nhiệt kế kỹ thuật số.

[0032] Ngưỡng có thể bao hàm tương quan nghịch với nhiệt độ môi trường (ví dụ, xem: **Hình 2**). Trong một số trường hợp, nhiệt độ môi trường được so sánh với nhiệt độ cơ bản. Nhiệt độ cơ bản có thể là nhiệt độ định trước mà từ đó điều chỉnh bất kỳ tiếp theo được thực hiện. Trong một số trường hợp, nếu nhiệt độ môi trường cao hơn nhiệt độ cơ bản, thì ngưỡng được giảm ít nhất là khoảng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, hoặc 10% đối với mỗi độ (Bách phân) nhiệt độ môi trường cao hơn nhiệt độ cơ bản. Trong một số trường hợp, nếu nhiệt độ môi trường là thấp hơn nhiệt độ cơ bản, thì ngưỡng được tăng ít nhất là khoảng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, hoặc 10% đối với mỗi độ (Bách phân) nhiệt độ môi trường cao hơn nhiệt độ cơ bản. Trong một số trường hợp, nếu nhiệt độ môi trường là thấp hơn nhiệt độ cơ bản, thì ngưỡng được tăng ít nhất là khoảng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, hoặc 10% đối với từng khoảng 2, 3, 4, hoặc 5 độ nhiệt độ môi trường cao hơn nhiệt độ cơ bản. Ví dụ, nếu nhiệt độ cơ bản là 24°C, thì nhiệt độ môi trường trung bình vào ngày mẫu được lấy từ đối tượng là 19°C, và ngưỡng có thể được giảm 1% cho 3 độ, ngưỡng cho đối tượng có thể được giảm 2% so với ngưỡng ở nhiệt độ 24°C. Trong một số trường hợp, nếu nhiệt độ môi trường cao hơn nhiệt độ cơ bản, ngưỡng có thể được tăng ít nhất là khoảng 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, hoặc 10% đối với từng khoảng 2, 3, 4, hoặc 5 độ nhiệt độ cao hơn nhiệt độ cơ bản.

[0033] Trong một số trường hợp, ngưỡng được xác định trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng và tình trạng hút thuốc của đối tượng. Trong một số trường hợp, ngưỡng được xác định trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng và nhiệt độ môi trường. Trong một số trường hợp, ngưỡng được xác định trên cơ sở tình trạng hút thuốc của đối tượng và nhiệt độ môi trường. Trong một số trường hợp, ngưỡng được xác định trên cơ sở lứa tuổi của đối tượng, tình trạng hút thuốc của đối tượng, và nhiệt độ môi trường.

[0034] Trong một số trường hợp, ngưỡng không được xác định trên cơ sở tình trạng bệnh mắc đồng thời của đối tượng, tình trạng dùng đồ uống có cồn hiện tại của đối tượng, thói quen tập thể dục của đối tượng, hoặc kết hợp các yếu tố này theo cách bất kỳ.

[0035] Trong một số trường hợp, tình trạng dùng đồ uống có cồn hiện tại của đối tượng biểu thị liệu đối tượng hiện là người dùng đồ uống có cồn hoặc hiện không là người dùng đồ uống có cồn. Người hiện dùng đồ uống có cồn có thể là đối tượng mà đã tham gia vào việc dùng đồ uống có cồn (ví dụ, tiêu thụ đồ uống có cồn) trong ngày, tuần, tháng, hoặc năm trước.

[0036] Trong một số trường hợp, thói quen tập thể dục của đối tượng biểu thị liệu đối tượng là người tập thể dục thường xuyên hay không. Người thường xuyên tập thể dục có thể là đối tượng thực hiện bài tập thể dục ở mức độ trung bình ít nhất là 15 phút, 30 phút, 45 phút, hoặc 60 phút ít nhất là một, hai, hoặc ba ngày mỗi tuần. Trong một số trường hợp, người thường xuyên tập thể dục có thể là đối tượng thực hiện bài tập thể dục ở mức độ trung bình ít nhất là 30 phút ít nhất là hai ngày mỗi tuần.

[0037] Trong một số trường hợp, tình trạng bệnh mắc đồng thời của đối tượng là hiện tượng có mặt hoặc sự không có mặt của một hoặc nhiều tình trạng bệnh đồng thời ở đối tượng. Một hoặc nhiều tình trạng bệnh đồng thời có thể bao gồm bệnh đái tháo đường, chứng cao huyết áp, tăng mỡ máu, bệnh tim thiếu máu cục bộ, hoặc tổ hợp của chúng.

[0038] Các phương pháp sàng lọc về sự có mặt của khối u theo sáng chế còn có thể bao gồm việc so sánh lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus với ngưỡng. Việc so sánh lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus với ngưỡng có thể được áp dụng để sàng lọc đối tượng có khối u.

[0039] Ngưỡng đã định, ví dụ, ngưỡng được xác định bằng cách sử dụng bộ luyện, có thể được so sánh với lượng axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus từ một hoặc nhiều mẫu sinh học từ một hoặc nhiều đối tượng mà có tình trạng khối u không rõ. Theo một ví dụ, nếu đối tượng có lượng ADN ngoài tế bào của EBV trong huyết tương cao hơn ngưỡng, thì đối tượng đó được xác định là có hoặc có nguy cơ có NPC. Ví dụ khác, nếu đối tượng có lượng ADN ngoài tế bào của EBV trong huyết tương thấp hơn ngưỡng, thì đối tượng đó được xác định là không có hoặc không có nguy cơ có NPC. Quy trình ví dụ để so sánh lượng đã phát hiện được của axit nucleic

ngoài tế bào của EBV với ngưỡng để xác định liệu đối tượng có NPC hay không được minh họa trên Hình 4.

[0040] Xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus

[0041] Lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus có thể được xác định, ví dụ, như được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20180237863. Trong một số trường hợp, việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus bao gồm việc khuếch đại axit nucleic ngoài tế bào từ virus. Việc khuếch đại có thể bao gồm phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), như PCR định lượng (qPCR, còn được gọi là PCR thời gian thực). Việc khuếch đại có thể bao gồm PCR phiên mã ngược, PCR thời gian thực, PCR định lượng thời gian thực, PCR kỹ thuật số (dPCR), PCR nhũ tương kỹ thuật số (dePCR), PCR theo dòng, PCR đa hình chiều dài đoạn đã được khuếch đại (AFLP PCR), PCR đặc hiệu với alen, PCR cụm, PCR bất đối xứng (trong đó lượng dư lớn các đoạn môi đối với sợi đã chọn có thể được sử dụng), khuếch đại thể chổ sợi, khuếch đại đa thể chổ, khuếch đại vòng lăn, PCR khuôn lạc, khuếch đại phụ thuộc helicaza (HDA), PCR bắt đầu nóng, phản ứng chuỗi ligaza, PCR nghịch (IPCR), PCR tại chổ, PCR dài (kéo dài ADN hơn khoảng 5 kilobazơ), khuếch đại phụ thuộc helicaza, phương pháp khuếch đại chia nhánh, PCR đa thành phần, PCR làm tổ (sử dụng nhiều hơn một cặp đoạn môi), PCR một tế bào, PCR cặp môi tránh khuếch đại trình tự không đặc hiệu, PCR đẳng nhiệt gián tiếp qua vòng (LAMP), khuếch đại recombinaza polymeraza (RPA), hoặc khuếch đại trên cơ sở trình tự axit nucleic (NASBA). Việc khuếch đại có thể bao gồm việc khuếch đại toàn bộ hệ gen hoặc việc khuếch đại được hướng đích. Trong một số trường hợp, trước khi khuếch đại, axit nucleic ngoài tế bào được phân lập từ mẫu sinh học. Axit nucleic ngoài tế bào có thể được phân tách ra khỏi mẫu sinh học này bằng cách chọn lọc các đoạn axit nucleic ngoài tế bào có kích cỡ nhất định. Axit nucleic ngoài tế bào có chiều dài ngắn hơn 150 cặp bazơ (bp), 200 cặp bazơ, hoặc 300 cặp bazơ có thể được phân tách ra khỏi mẫu sinh học. Trong một số trường hợp, axit nucleic ngoài tế bào từ 150 cặp bazơ đến 300 cặp bazơ được phân lập. Trong một số trường hợp, axit nucleic ngoài tế bào từ 150 cặp bazơ đến 200 cặp bazơ được phân lập. Trong một số trường hợp, axit nucleic ngoài tế bào từ 180 cặp bazơ đến 200 cặp bazơ được phân lập. Trong một số trường hợp, axit nucleic ngoài tế bào từ 80 cặp bazơ đến 110 cặp bazơ được phân lập.

[0042] Lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus có thể được xác định, ví dụ, bằng phép đo quang phổ (ví dụ, đo quang phổ UV, ví dụ, NANODROP), đo huỳnh quang (ví dụ, bằng cách áp dụng nhuộm QUANTIFLUOR), vi mảng (ví dụ, vi mảng ADN), đo quang phổ khối, giải trình tự, ví dụ, giải trình tự thế hệ tiếp theo. Việc giải trình tự có thể bao gồm việc giải trình tự kết thúc chuỗi, giải trình tự lai, 454 trình tự (ROCHE), giải trình tự bằng cách sử dụng nhuộm kết thúc thuận nghịch (giải trình tự ILLUMINA), giải trình tự bán dẫn (THERMOFISHER ION

TORRENT), giải trình tự đo quang phổ khối, giải trình tự chữ ký song song lớn (MPSS), giải trình tự theo Maxam-Gilbert, giải trình tự lỗ cỡ nano (ví dụ, bằng cách sử dụng công nghệ từ OXFORD NANOPORE hoặc GENIA), giải trình tự phát hiện một phân tử theo cách điện tử (ví dụ, đo dòng đường hầm thông qua điện cực nano như axit nucleic (ADN/ARN) đi qua bước cách nano và tính chênh lệch về dòng; ví dụ, bằng cách áp dụng giải trình tự lượng tử từ QUANTUM BIOSYSTEMS), trình tự một phân tử vi giọt ví dụ, bằng cách áp dụng pyrophospho phân (ví dụ, bằng cách áp dụng công nghệ từ BASE4), giải trình tự dôi, giải trình tự nhiệt, giải trình tự súng sấm, giải trình tự thời gian thực một phân tử (SMRT) (do PACIFIC BIOSCIENCES cung cấp), công nghệ GenapSys Gene Electronic Nano-Integrated Ultra-Sensitive (do GENIUS cung cấp) từ GENAPSYS, GENEREADER từ QIAGEN, hoặc giải trình tự SOLiD.

[0043] Phương pháp có thể bao gồm bước làm giàu axit nucleic ngoài tế bào từ virus từ mẫu trước khi giải trình tự. Bước làm giàu có thể bao gồm việc sử dụng các mẫu lai để bắt axit nucleic ngoài tế bào từ virus. Trong một số trường hợp, phương pháp không đòi hỏi việc làm giàu axit nucleic ngoài tế bào từ virus từ mẫu trước khi giải trình tự. Phương pháp có thể bao gồm việc lắp ráp thư viện giải trình tự. Ví dụ, thư viện giải trình tự có thể được dựng như đã được bộc lộ (ví dụ, xem tài liệu: Lam *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 May 29; 115(22): E5115–E5124).

[0044] Một hoặc nhiều đích có thể được làm giàu, ví dụ, bằng cách sử dụng SEQCAP do ROCHE cung cấp. Axit nucleic, ví dụ, ADN, ví dụ, ADN hệ gen, có thể được phân đoạn, ví dụ, bằng cách xử lý bằng năng lượng âm thanh. ADN đã được phân đoạn có thể được ghép đôi để bắt mẫu. Mẫu bắt được có thể được đánh dấu. Mẫu có thể liên kết với nền rắn, ví dụ, hạt từ tính đã được phủ streptavidin. Các đích bắt được có thể được giải phóng, được khuếch đại, và được giải trình tự.

[0045] Một hoặc nhiều đích có thể được làm giàu, ví dụ, bằng cách sử dụng hệ làm giàu đích HALOPLEX do AGILIENT TECHNOLOGIES cung cấp. Axit nucleic, ví dụ, ADN, ví dụ, ADN hệ gen, có thể được phân đoạn, ví dụ, bằng cách phân cắt bằng enzym cắt giới hạn. Mẫu khi có catxet đoạn môi chú dẫn có thể được dùng để tạo ra đoạn ADN mà được quay vòng và có một hoặc nhiều chú dẫn tích hợp và tùy ý có một hoặc nhiều motif giải trình tự hữu ích cho hệ giải trình tự, ví dụ, giải trình tự ILLUMINA. Mẫu có thể chứa dấu, ví dụ, biotin, mà có thể được bổ sung vào, ví dụ, bằng cách biotiny hóa. Mẫu đã đánh dấu có thể được bắt, ví dụ, bằng cách sử dụng hạt đã được phủ streptavidin (ví dụ, hạt từ tính). Các đích bắt được có thể được khuếch đại, ví dụ, theo phương pháp PCR, và được phân tích, ví dụ, bằng cách giải trình tự, ví dụ, giải trình tự thế hệ tiếp theo.

[0046] Một hoặc nhiều đích có thể được làm giàu bằng cách sử dụng một hoặc nhiều mẫu bẫy, ví dụ, bằng cách sử dụng SURESELECT Target Enrichment theo công nghệ của Agilent. axit nucleic, ví dụ, ADN, ví dụ, ADN hệ gen, có thể được phân đoạn, ví dụ, bằng cách xử lý bằng năng lượng âm thanh. Một hoặc nhiều đích có thể được làm giàu bằng cách sử dụng một hoặc nhiều mẫu, ví dụ, một hoặc nhiều mẫu ARN hỗ trợ, khoảng 10 đến 200 bazơ, khoảng 20 đến 175 bazơ, khoảng 25 đến 150 bazơ, hoặc khoảng 120 bazơ. Một hoặc nhiều mẫu, ví dụ, một hoặc nhiều mẫu ARN hỗ trợ, có thể được đánh dấu bằng dấu, ví dụ, biotin, và dấu có thể liên kết với nền rắn, ví dụ, hạt (ví dụ, hạt từ tính), ví dụ, thông qua gốc liên kết, ví dụ, streptavidin. Nền rắn, ví dụ, hạt, ví dụ, hạt từ tính, có thể bị bẫy, ví dụ, bằng cách sử dụng nam châm. Một hoặc nhiều các đích bẫy được có thể được tháo khỏi nền rắn (ví dụ, bằng cách phân giải mẫu ARN hỗ trợ) đã được khuếch đại, ví dụ, theo phương pháp PCR, và phân tích, ví dụ, bằng cách giải trình tự, ví dụ, giải trình tự thế hệ tiếp theo.

[0047] Một hoặc nhiều đích có thể được làm giàu, ví dụ, bằng cách sử dụng transposaza, ví dụ, bằng cách áp dụng cách phân cắt gắn thẻ NEXTERA. Một hoặc nhiều đích có thể được làm giàu bằng cách bổ sung các chất thích ứng vào thông qua sự vận động và tiếp đó là khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi mà ghép mồi với các chất thích ứng theo phương pháp PCR.

[0048] Một hoặc nhiều đích có thể được làm giàu bằng cách áp dụng công nghệ làm giàu một đoạn mồi (Single Primer Enrichment Technology - SPET) do NUGEN cung cấp. Các chất thích ứng có thể được gắn vào các phân đoạn axit nucleic. Các đoạn mồi chứa chất thích ứng ở đầu 3' có thể được ghép đôi với trình tự đích và được kéo dài. Các sản phẩm đã được kéo dài có thể được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi cho các trình tự thích ứng và các sản phẩm khuếch đại có thể được phân tích bằng cách giải trình tự, ví dụ, giải trình tự thế hệ tiếp theo.

[0049] Việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus có thể bao gồm việc xác định nhiều bản sao của axit nucleic ngoài tế bào từ virus. Ví dụ, số lượng bản sao của axit nucleic cụ thể ngoài tế bào của virus, ví dụ, ADN ngoài tế bào, trình tự trong mỗi đơn vị thể tích (ví dụ, ml) mẫu sinh học có thể được xác định. Việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus có thể bao gồm việc xác định số lượng bản sao của hệ gen (ví dụ, của EBV) của virus trong mỗi đơn vị thể tích (ví dụ, mililit) mẫu sinh học (ví dụ, huyết tương).

[0050] Việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus có thể bao gồm việc khuếch đại ít nhất là một trình tự của virus. Trình tự của virus có thể thu được từ virus Epstein-Barr (EBV). Trình tự của EBV có thể là trình tự mã hóa protein ẩn ở màng (LMP), kháng nguyên của nhân virus Epstein-Barr (EBNA), virus Epstein-Barr mã hóa ARN nhỏ (EBER), polymeraza của EBV (Pol), protein phụ của polymeraza của EBV (ví dụ, BMRF1), phân đoạn BamHI, hoặc tổ hợp của chúng. Các ví dụ về LMP bao gồm LMP-1, LMP-2A, và LMP-2B. Các ví dụ về EBNA bao

gồm EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3a, EBNA-3b, và EBNA-3c. Các ví dụ về EBER bao gồm EBER-1 và EBER-2. Các ví dụ về các phân đoạn BamHI bao gồm BamHI-A, BamHI-C, và BamHI-W. Trong một số trường hợp, việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus bao gồm việc xác định lượng một, hai, ba, bốn, năm, hoặc nhiều hơn năm trình tự của virus.

[0051] Trong một số trường hợp, việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào bao gồm việc giải trình tự axit nucleic ngoài tế bào từ virus. Việc giải trình tự có thể tạo ra các kết quả đọc trình tự. Việc căn chỉnh của các kết quả đọc trình tự với hệ gen của người hoặc hệ gen của virus có thể phân biệt các trình tự có nguồn gốc từ hệ gen của người (ví dụ, hệ gen của đối tượng) và các trình tự có nguồn gốc từ hệ gen không của người (ví dụ, hệ gen của virus này). Việc giải trình tự có thể bao gồm giải trình tự toàn bộ hệ gen hoặc giải trình tự hướng đích. Việc giải trình tự hướng đích có thể bao gồm việc khuếch đại ít nhất là một trình tự của virus, ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này. Việc giải trình tự có thể là việc giải trình tự song song với số lượng lớn. Việc giải trình tự có thể bao gồm giải trình tự các phân tử đơn đã được mở rộng theo dòng hoặc không được khuếch đại của các phân đoạn axit nucleic. Việc giải trình tự có thể bao gồm giải trình tự kết thúc chuỗi, giải trình tự lai, giải trình tự Illumina® (ví dụ, bằng cách sử dụng chất nhuộm kết thúc thuận nghịch), giải trình tự bằng Ion Torrent™ (ví dụ, bán dẫn), giải trình tự đo quang phổ khối, giải trình tự chữ ký song song lớn (MPSS), giải trình tự theo Maxam-Gilbert, giải trình tự lỗ cỡ nano, giải trình tự dòi, giải trình tự nhiệt, giải trình tự súng sấm, giải trình tự thời gian thực một phân tử (SMRT), giải trình tự SOLiD® (ví dụ, bằng cách sử dụng mẫu hai bazơ đã được đánh dấu bằng huỳnh quang), giải trình tự phổ quát, hoặc tổ hợp chúng theo cách bất kỳ. Theo một số phương án, việc khuếch đại có thể bao gồm PCR kỹ thuật số. Việc giải trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nền tảng Illumina® NextSeq 500 hoặc nền tảng NextSeq 550.

[0052] Virus và khối u

[0053] Virus có thể là virus liên quan đến ung thư. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về virus mà có thể gây ra, hoặc liên quan đến, ung thư ở đối tượng bao gồm virus gây u nhú ở người (HPV), virus Epstein-Barr (EBV), virus gây bệnh viêm gan B (HBV), virus gây bệnh viêm gan C (HCV), virus gây suy giảm miễn dịch ở người (ví dụ, liên quan đến sarcoma Kaposi, ung thư cổ tử cung, u bạch huyết không thuộc dạng Hodgkin, ung thư hậu môn, bệnh Hodgkin, ung thư phổi, ung thư miệng, ung thư miệng-hầu, ung thư da, và ung thư gan), virus herpes 8 ở người (ví dụ, liên quan đến sarcoma Kaposi, ung thư máu, u bạch huyết tràn dịch nguyên phát, và bệnh Castleman), virus hướng bạch huyết T-1 ở người (ví dụ, liên quan đến bệnh bạch cầu tế bào lympho, u bạch huyết không thuộc dạng Hodgkin, và bệnh bạch cầu/u bạch huyết tế bào T ở người lớn), và virus poliovirus ở tế bào Merkel (ví dụ, liên quan đến ung thư da như ung thư biểu

mô tế bào Merkel). Virut có thể là virut Epstein-Barr (EBV). Khối u có thể là khối u gây ra bởi virut hoặc liên quan đến virut. Khối u có thể là khối u gây ra bởi hoặc liên quan đến virut Epstein-Barr. Các ví dụ về loại u gây ra bởi hoặc liên quan đến EBV bao gồm ung thư mũi hầu biểu mô, u bạch huyết (ví dụ, u bạch huyết Burkitt hoặc u bạch huyết Hodgkin), và ung thư dạ dày. Trong một số trường hợp, khối u là ung thư mũi hầu biểu mô (NPC).

[0054] Mẫu sinh học và axit nucleic

[0055] Mẫu sinh học có thể là máu toàn phần, huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, dịch màng phổi, hoặc dịch bạch huyết. Trong một số trường hợp, mẫu sinh học này là huyết tương. Mẫu sinh học có thể chứa tế bào lympho của máu ngoại vi (PBL), tế bào đơn nhân của máu ngoại vi (PBMC). Mẫu sinh học có thể chứa axit nucleic ngoài tế bào, mà có thể là axit nucleic bất kỳ tìm thấy ở mẫu sinh học không chứa trong tế bào nguyên vẹn. Axit nucleic ngoài tế bào có thể là ADN ngoài tế bào (cfDNA) hoặc ARN ngoài tế bào. Axit nucleic ngoài tế bào có thể là axit nucleic tuần hoàn, ví dụ, ADN hoặc ARN tuần hoàn. Ít nhất là một phần axit nucleic ngoài tế bào ở mẫu sinh học này có thể có nguồn gốc virut, và/hoặc có thể từ khối u. Axit nucleic ngoài tế bào thu được từ khối u mà được tìm thấy ở dòng máu có thể được gọi là axit nucleic tuần hoàn của khối u, ví dụ, ADN tuần hoàn của khối u (ctDNA). Ví dụ về axit nucleic ngoài tế bào có thể là ADN của huyết tương. Ví dụ về axit nucleic ngoài tế bào thu được từ virut có thể là ADN của EBV trong huyết tương.

[0056] Đối tượng

[0057] Mẫu sinh học có thể được lấy từ đối tượng. Đối tượng có thể là người. Theo cách khác, đối tượng có thể là động vật linh trưởng không là người (ví dụ, khỉ đột, con tinh tinh, con tinh tinh lùn, khỉ không đuôi, đười ươi, vượn cáo, hoặc khỉ đầu chó), chó, mèo, dê, chuột lang, chuột đồng, chuột, lợn, dê, bò cái, lạc đà, hoặc cá ngựa vằn. Đối tượng có thể là đối tượng được sàng lọc khối u. Mẫu có thể thu được từ đối tượng theo cách xâm lấn (ví dụ, cách phẫu thuật) hoặc theo cách không xâm lấn (ví dụ, lấy máu, miếng gạc, hoặc gom mẫu thải).

[0058] Các thử nghiệm bổ sung

[0059] Theo một số phương án, các phương pháp theo sáng chế bao gồm thực hiện hai hoặc nhiều thử nghiệm (ví dụ, thử nghiệm thứ nhất và thử nghiệm thứ hai). Thử nghiệm này (ví dụ, thử nghiệm thứ nhất và/hoặc thử nghiệm thứ hai) có thể là thử nghiệm đã được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20180237863 (ví dụ, xem: Hình 5). Ví dụ, mẫu máu có thể thu được từ một đối tượng, và các tế bào có thể được lấy ra khỏi huyết tương chứa ADN ngoài tế bào (cfDNA), ví dụ, bằng cách thực hiện ly tâm hai lần liên tiếp nhau 5202. Bước ly tâm có thể được thực hiện trong thời gian 10 phút với tốc độ $2.000 \times g$ để làm kiệt tiểu cầu và tế bào ra khỏi mẫu huyết tương. Khoảng 0,8 mililit huyết tương từ một trong số hai mẫu máu gom được có thể

được sử dụng cho phân tích qPCR để phát hiện số bản sao ADN có nguồn gốc từ khối u (ADN của EBV) ở mẫu 5203. Bước chiết ADN ngoài tế bào có thể được thực hiện 5204 trên mẫu huyết tương để làm giàu ADN ngoài tế bào ở mẫu huyết tương, và chuẩn bị mẫu cho phân tích qPCR. Nhiệt độ làm biến tính, ghép, và mở rộng cho phân tích qPCR có thể được xác định 5205 (ví dụ, trên cơ sở chiều dài/hàm lượng GC của các đoạn môi được sử dụng, và/hoặc nồng độ của tổng ADN ngoài tế bào ở mẫu), và phân tích qPCR có thể được thực hiện 5206 để phát hiện lượng ADN ngoài tế bào có nguồn gốc từ khối u ở mẫu này. Để phát hiện ADN của EBV, các đoạn môi bọc sườn trình tự BamHI của hệ gen có thể được sử dụng. Ngưỡng có thể được thiết lập trên cơ sở lứa tuổi và/hoặc tình trạng hút thuốc của đối tượng và/hoặc nhiệt độ môi trường tại thời điểm mẫu được lấy từ đối tượng. Nếu lượng ADN của EBV phát hiện được thấp hơn ngưỡng 5207, thì kết quả âm tính có thể được cung cấp và trong một số trường hợp, thử nghiệm thứ hai không được thực hiện. Nếu lượng ADN ngoài tế bào phát hiện được là bằng hoặc cao hơn ngưỡng 5208, thì thử nghiệm thứ hai có thể được thực hiện bằng cách sử dụng huyết tương từ mẫu máu thứ hai được gom. Ví dụ, khoảng 4 mililit huyết tương có thể được sử dụng để giải trình tự thể hệ tiếp theo 5209 để xác định biên dạng kích cỡ của ADN ngoài tế bào trong mẫu này. Việc chiết ADN ngoài tế bào có thể được thực hiện 5210 trên mẫu huyết tương thứ hai để làm giàu ADN ngoài tế bào ở mẫu huyết tương, và chuẩn bị mẫu cho phân tích giải trình tự thể hệ tiếp theo. Bước chuẩn bị thư viện có thể được thực hiện 5211 để buộc các oligonucleotit thích nghi vào các đoạn ADN ngoài tế bào ở mẫu cần được giải trình tự. ADN ngoài tế bào có thể được phân đoạn thành chiều dài tối ưu cho nền xuôi. Trong một số trường hợp, việc phân đoạn ADN không tạo ra các phân đoạn đầu cùn đồng nhất; việc sửa chữa đầu cuối có thể được áp dụng để đảm bảo rằng mỗi phân tử không bao gồm đầu treo, và bao gồm các nhóm phosphat ở đầu 5' và hydroxyl ở đầu 3'. Việc kết hợp deoxyadenosin 5'-monophosphat không tạo khuôn (dAMP) vào đầu tận cùng 3' của các phân đoạn ADN đầu bằng, quy trình đã được biết là gắn đuôi dA, có thể được thực hiện. Việc làm giàu hướng đích ADN của EBV có thể được thực hiện 5212; Việc làm giàu hướng đích ADN của EBV có thể cho phép giải trình tự các vùng cụ thể đang được quan tâm thay cho toàn bộ hệ gen. Việc giải trình tự thể hệ tiếp theo có thể được thực hiện trên mẫu đã được làm giàu 5213. Các kết quả đọc trình tự tương ứng với ADN ngoài tế bào đã được xác định trình tự ở mẫu đã được làm giàu huyết tương có thể thu được, và tùy ý được căn chỉnh với hệ gen tham chiếu. Phân tích có thể được thực hiện, ví dụ, lượng EBV có thể được đánh giá và biên dạng kích cỡ của các phân đoạn ADN của EBV có thể được tạo ra 5214. Báo cáo có thể được xuất dữ liệu biểu thị liệu đối tượng mà từ đó mẫu thu được có ung thư mũi hầu hay không 5215.

[0060] Theo một ví dụ, thử nghiệm thứ nhất có thể được thực hiện để thiết lập lượng cơ bản của axit nucleic có nguồn gốc virus đối với đối tượng trước khi áp dụng điều trị trong khi thử nghiệm thứ hai có thể được thực hiện trên mẫu từ cùng một đối tượng sau khi áp dụng điều trị. Ví dụ khác, thử nghiệm thứ nhất có thể là thử nghiệm định tính trên mẫu từ đối tượng để xác định liệu đối tượng có axit nucleic ngoài tế bào từ virus hay không trong khi thử nghiệm thứ hai có thể là thử nghiệm định lượng trên mẫu từ cùng một đối tượng để xác định liệu đối tượng là dương tính giả với khối u được phát hiện (ví dụ, lượng axit nucleic ngoài tế bào thấp hơn ngưỡng, rất có khả năng là sau khi điều chỉnh ngưỡng vì thuộc tính độc lập với đối tượng hoặc phụ thuộc vào đối tượng được bộc lộ trong bản mô tả này). Theo ví dụ khác nữa, thử nghiệm thứ nhất có thể được thực hiện trên mẫu từ đối tượng để xác định liệu đối tượng là dương tính giả với khối u được phát hiện hay không (ví dụ, lượng axit nucleic ngoài tế bào thấp hơn ngưỡng, rất có khả năng là sau khi điều chỉnh ngưỡng vì thuộc tính độc lập với đối tượng hoặc phụ thuộc vào đối tượng được bộc lộ trong bản mô tả này) trong khi thử nghiệm thứ hai có thể được thực hiện trên mẫu từ đối tượng để xác nhận sự có mặt của khối u.

[0061] Trong một số trường hợp, phần thứ nhất của mẫu sinh học này được dùng trong thử nghiệm thứ nhất và phần thứ hai mẫu sinh học này được dùng trong thử nghiệm thứ hai. Trong các trường hợp khác, mẫu sinh học được dùng trong thử nghiệm thứ nhất và mẫu sinh học thứ hai được dùng trong thử nghiệm thứ hai, trong đó mẫu sinh học thứ hai được gom tại thời điểm khác với mẫu sinh học thứ nhất từ cùng một đối tượng. Mẫu sinh học thứ hai có thể được gom ít nhất là 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng, 4 tháng, 5 tháng, 6 tháng, 1 năm, 2 năm, 3 năm, 4 năm, hoặc 5 năm sau mẫu sinh học thứ nhất.

[0062] Trong một số trường hợp, phương pháp còn bao gồm việc thực hiện sàng lọc thứ hai về khối u nếu lượng axit nucleic ngoài tế bào biểu thị đối tượng có hoặc bị nghi có khối u. Ví dụ, đối tượng có thể bị nghi có khối u nếu lượng EBV ADN của EBV ngoài tế bào trong huyết tương cao hơn ngưỡng. Sàng lọc thứ hai có thể là thử nghiệm thứ hai để xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virus ở mẫu, như bằng cách khuếch đại axit nucleic ngoài tế bào từ virus. Sàng lọc thứ hai có thể bao gồm việc thực hiện nội soi, soi mũi, sinh thiết, tia X, chụp tia X cắt lớp bằng máy tính (CT hoặc CAT), chụp cộng hưởng từ (MRI), siêu âm, quét xương, kiểm tra thần kinh, thử thính lực, chụp tia X cắt lớp phát xạ positron (PET) hoặc quét PET-CT, hoặc tổ hợp của chúng, ở đối tượng. Sàng lọc thứ hai có thể xác nhận có hoặc không có khối u ở đối tượng.

[0063] **Điều trị bệnh**

[0064] Trong một số trường hợp, các phương pháp theo sáng chế còn bao gồm việc điều trị khối u ở đối tượng khi sàng lọc, sàng lọc thứ hai, hoặc tổ hợp của chúng biểu thị khối u có ở đối tượng. Việc điều trị khối u ở đối tượng có thể bao gồm việc áp dụng phép trị liệu. Phép trị liệu có thể là phương pháp hóa trị, xạ trị, phẫu thuật, điều trị hướng đích hoặc tổ hợp của chúng. Trong một số trường hợp, liệu pháp tia phóng xạ để gần được áp dụng xạ trị. Trong một số trường hợp, phẫu thuật là cắt vòm. Điều trị hướng đích có thể là kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng có thể là kháng thể mà hướng đích đến yếu tố sinh trưởng biểu bì thụ thể (EGFR). Kháng thể đơn dòng có thể là bevacizumab, cetuximab, hoặc nivolumab. Điều trị hướng đích có thể là chất ức chế điểm, ví dụ, kháng thể kháng PDL1 hoặc kháng thể kháng PD1.

[0065] Trong một số trường hợp, các phương pháp theo sáng chế còn bao gồm áp dụng điều trị dự phòng cho đối tượng. Trong một số trường hợp, các phương pháp theo sáng chế còn bao gồm việc đặt đối tượng ở điều kiện kiểm soát bổ sung đối với khối u. Việc điều trị dự phòng có thể được áp dụng cho đối tượng, hoặc đối tượng có thể được đặt ở điều kiện kiểm soát bổ sung đối với khối u, khi đối tượng có yếu tố nguy cơ về khối u, sàng lọc biểu thị sự có mặt của ADN của EBV trên ngưỡng, và sàng lọc thứ hai không biểu thị sự có mặt của khối u. Các yếu tố nguy cơ về NPC có thể là tổ tiên châu Á, tiêu thụ đồ uống có cồn, hút thuốc lá, có người thân có NPC, và tổ hợp của chúng. Giám sát bổ sung đối với khối u có thể bao gồm sàng lọc thứ hai như được bộc lộ trong bản mô tả này. Việc giám sát bổ sung có thể được thực hiện trên đối tượng năm năm một lần, bốn năm một lần, ba năm một lần, hai năm một lần, mỗi năm một lần, hai lần mỗi năm, ba lần mỗi năm, bốn lần mỗi năm, năm lần mỗi năm, hoặc sáu lần mỗi năm. Việc giám sát bổ sung có thể được thực hiện cùng với sàng lọc về sự có mặt của khối u được bộc lộ trong bản mô tả này.

[0066] Làm giảm tỷ lệ dương tính giả

[0067] Tỷ lệ dương tính giả trong việc phát hiện khối u có thể được giảm bằng cách điều chỉnh mức độ ngưỡng của axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus là dấu hiệu chỉ báo về khối u trên cơ sở các thuộc tính phụ thuộc đối tượng hoặc độc lập với đối tượng, như được bộc lộ trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, khối u là ung thư mũi hầu, và ung thư mũi hầu có thể được sàng lọc dựa vào sự có mặt của ADN của EBV trong huyết tương cao hơn ngưỡng.

[0068] Trong một số trường hợp, việc không điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả khoảng 5,5%. Trong một số trường hợp, việc không điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả cao hơn 5,5%.

[0069] Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả khoảng 0,5%, khoảng 0,6%, khoảng 0,7%, khoảng 0,8%, khoảng 0,9%, khoảng 1,0%, khoảng 1,1%, khoảng 1,2%, khoảng 1,3%, khoảng 1,4%, khoảng 1,5%, khoảng 1,6%, khoảng 1,7%, khoảng

1,8%, khoảng 1,9%, khoảng 2,0%, khoảng 2,1%, khoảng 2,2%, khoảng 2,3%, khoảng 2,4%, khoảng 2,5%, khoảng 2,6%, khoảng 2,7%, khoảng 2,8%, khoảng 2,9%, khoảng 3,0%, khoảng 3,1%, khoảng 3,2%, khoảng 3,3%, khoảng 3,4%, khoảng 3,5%, khoảng 3,6%, khoảng 3,7%, khoảng 3,8%, khoảng 3,9%, khoảng 4,0%, khoảng 4,1%, khoảng 4,2%, khoảng 4,3%, khoảng 4,4%, khoảng 4,5%, khoảng 4,6%, khoảng 4,7%, khoảng 4,8%, khoảng 4,9%, khoảng 5,0%, khoảng 5,1%, khoảng 5,2%, khoảng 5,3%, hoặc khoảng 5,4%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả thấp hơn 0,5%, thấp hơn 0,6%, thấp hơn 0,7%, thấp hơn 0,8%, thấp hơn 0,9%, thấp hơn 1,0%, thấp hơn 1,1%, thấp hơn 1,2%, thấp hơn 1,3%, thấp hơn 1,4%, thấp hơn 1,5%, thấp hơn 1,6%, thấp hơn 1,7%, thấp hơn 1,8%, thấp hơn 1,9%, thấp hơn 2,0%, thấp hơn 2,1%, thấp hơn 2,2%, thấp hơn 2,3%, thấp hơn 2,4%, thấp hơn 2,5%, thấp hơn 2,6%, thấp hơn 2,7%, thấp hơn 2,8%, thấp hơn 2,9%, thấp hơn 3,0%, thấp hơn 3,1%, thấp hơn 3,2%, thấp hơn 3,3%, thấp hơn 3,4%, thấp hơn 3,5%, thấp hơn 3,6%, thấp hơn 3,7%, thấp hơn 3,8%, thấp hơn 3,9%, thấp hơn 4,0%, thấp hơn 4,1%, thấp hơn 4,2%, thấp hơn 4,3%, thấp hơn 4,4%, thấp hơn 4,5%, thấp hơn 4,6%, thấp hơn 4,7%, thấp hơn 4,8%, thấp hơn 4,9%, thấp hơn 5,0%, thấp hơn 5,1%, thấp hơn 5,2%, thấp hơn 5,3%, hoặc thấp hơn 5,4%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả thấp hơn 5,5%.

[0070] Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 0,5% và khoảng 5,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 1,0% và khoảng 5,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 1,5% đến 5,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 2,0% đến 5,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 2,5% đến 5,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 3,0% đến 5,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 3,5% đến 5,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 4,0% đến 5,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 4,5% đến 5,0%.

[0071] Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 0,5% đến 4,5%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 1,0% đến 4,5%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 1,5% đến 4,5%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 2,0% đến 4,5%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng

[0075] Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 0,5% đến 2,5%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 1,0% đến 2,5%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 1,5% đến 2,5%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 2,0% đến 2,5%.

[0076] Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 0,5% đến 2,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 1,0% đến 2,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 1,5% đến 2,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 0,5% đến 1,5%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 1,0% đến 1,5%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 0,5% đến 1,0%. Trong một số trường hợp, việc điều chỉnh ngưỡng dẫn đến tỷ lệ dương tính giả nằm trong khoảng từ 3,8% đến 4,5%.

[0077] Theo một ví dụ, việc điều chỉnh mức độ ngưỡng của axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus là dấu hiệu chỉ báo về khối u trên cơ sở nhiệt độ môi trường có thể gây ra tỷ lệ dương tính giả khoảng 4,5%. Tỷ lệ dương tính giả khoảng 4,5% có thể đạt được khi các mẫu được gom vào các ngày có nhiệt độ trên 30°C. Ví dụ khác, việc điều chỉnh mức độ ngưỡng của axit nucleic ngoài tế bào có nguồn gốc virus là dấu hiệu chỉ báo về khối u trên cơ sở lứa tuổi có thể gây ra tỷ lệ dương tính giả khoảng 3,8%. Tỷ lệ dương tính giả khoảng 3,8% có thể đạt được khi các mẫu được gom từ đối tượng trẻ hơn hoặc bằng 45 tuổi.

[0078] Các chiến lược khác nhau có thể được áp dụng để làm giảm tỷ lệ dương tính giả của việc sàng lọc ADN của EBV trong huyết tương. Các kỳ sàng lọc có thể được lên lịch vào ngày có nhiệt độ cao hơn, ví dụ, trong mùa hè. Việc điều chỉnh chi phí phân tích có thể được thực hiện theo mức chênh lệch về tỷ lệ dương tính giả dự đoán do nhiệt độ môi trường. Một lần thực thi có thể thu phí xét nghiệm thấp hơn vào mùa đông và phí xét nghiệm cao hơn vào mùa hè do tỷ lệ dương tính giả cao hơn trong mùa đông, để giải thích cho nhu cầu thấp hơn vào mùa đông đối với xét nghiệm kém chính xác hơn. Cách thực thi thay thế có thể là thu phí xét nghiệm cao hơn vào mùa đông và phí xét nghiệm thấp hơn trong mùa hè, để khuyến khích nhiều người hơn được sàng lọc trong mùa hè để nâng cao mức độ chính xác chung của thử nghiệm. Các đối tượng mà chọn tham gia sàng lọc có thể được khuyến khích giữ ấm hoặc tránh tiếp xúc với nhiệt độ lạnh trong vài ngày trước khi xét nghiệm sàng lọc. Việc điều chỉnh có thể được thực hiện, ví dụ, theo thời gian trong năm hoặc tháng, hoặc nhiệt độ thực trong ngày hoặc tuần khi việc xét nghiệm được thực hiện. Việc bố trí cũng có thể được điều chỉnh theo vị trí địa lý của nơi xét nghiệm, ví dụ, thu phí xét nghiệm thấp hơn ở các vùng gần xích đạo. Ngưỡng định lượng có thể được áp dụng đối với nồng độ ADN của huyết tương. Ngưỡng định lượng có thể được điều chỉnh theo nhiệt độ môi trường. Ví dụ, ngưỡng cao hơn (ví dụ, nồng độ ADN của EBV trong huyết tương cao hơn là cần thiết để đạt được kết quả tích cực) có thể được sử dụng khi nhiệt độ môi trường thấp

hơn trong khi ngưỡng thấp hơn (ví dụ, nồng độ ADN của EBV trong huyết tương thấp hơn là cần thiết để đạt được kết quả tích cực) nếu nhiệt độ môi trường cao hơn.

[0079] Vì mối tương quan tích cực giữa lứa tuổi của đối tượng và nồng độ ADN của EBV trong huyết tương từ đối tượng, các chiến lược có thể được phát triển để nâng cao hiệu quả chi phí của chương trình sàng lọc. Ví dụ, các nhóm lứa tuổi trẻ hơn có thể được khuyến khích tham gia vào sàng lọc bằng cách giảm phí xét nghiệm. Cách bố trí này có thể là hữu ích nếu chi phí của thử nghiệm tiếp, ví dụ, nội soi mũi hoặc chụp cộng hưởng từ, có thể được hoàn trả cho những đối tượng mà đã được xét nghiệm dương tính với ADN của EBV trong huyết tương. Việc hoàn trả có thể được liên kết với bảo hiểm. Ngưỡng định lượng có thể được áp dụng đối với nồng độ ADN của huyết tương. Ngưỡng định lượng có thể được điều chỉnh theo lứa tuổi của đối tượng cần được sàng lọc. Ví dụ, ngưỡng cao hơn (ví dụ, nồng độ ADN của EBV trong huyết tương cao hơn là cần thiết để đạt được kết quả tích cực) có thể được sử dụng cho các nhóm cao tuổi hơn trong khi ngưỡng thấp hơn (ví dụ, nồng độ ADN của EBV trong huyết tương thấp hơn là cần thiết để đạt được kết quả tích cực) đối với các nhóm trẻ tuổi hơn.

[0080] Các chiến lược tương tự có thể được áp dụng để điều chỉnh phí xét nghiệm giữa người hút thuốc lá và người không hút thuốc lá. Người hút thuốc lá có thể bị thu phí xét nghiệm cao hơn để bù đắp cho tỷ lệ dương tính giả cao hơn. Cách phân bổ phí này có thể là hữu ích nếu chi phí cho thử nghiệm tiếp được hoàn trả cho đối tượng mà được xét nghiệm dương tính với ADN của EBV trong huyết tương. Ngưỡng định lượng có thể được áp dụng đối với nồng độ ADN của huyết tương. Ngưỡng định lượng có thể được điều chỉnh theo thói quen hút thuốc lá của đối tượng cần được sàng lọc. Ví dụ, ngưỡng cao hơn (ví dụ, nồng độ ADN của EBV trong huyết tương cao hơn là cần thiết để đạt được kết quả tích cực) có thể được sử dụng cho người hút thuốc lá trong khi ngưỡng thấp hơn (ví dụ, nồng độ ADN của EBV trong huyết tương thấp hơn là cần thiết để đạt được kết quả tích cực) có thể được sử dụng cho người không hút thuốc lá.

[0081] Hệ máy tính

[0082] Trong một số trường hợp nhất định, sáng chế đề xuất các sản phẩm máy tính bao gồm vật ghi đọc được bằng máy tính chứa nhiều lệnh để kiểm soát hệ thống máy tính để thực hiện các thao tác của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp nhất định, sáng chế còn đề xuất các hệ thống bao gồm sản phẩm máy tính được bộc lộ trong bản mô tả này và một hoặc nhiều bộ xử lý để thực hiện các lệnh lưu trên vật ghi đọc được bằng máy tính.

[0083] **Hình 3** thể hiện hệ thống máy tính 301 mà được lập trình hoặc được tạo cấu hình theo cách khác để liên lạc với và điều tiết các khía cạnh khác nhau của hệ thống máy tính theo sáng chế.

[0084] Hệ thống máy tính 301 có thể điều tiết các khía cạnh khác nhau theo sáng chế, ví dụ, xác định hoặc điều chỉnh ngưỡng của ADN có nguồn gốc virus là dấu hiệu chỉ báo về khối u ở đối tượng. Hệ thống máy tính 301 có thể là thiết bị điện tử của người dùng hoặc hệ thống máy tính mà nằm cách xa thiết bị điện tử. Thiết bị điện tử có thể là thiết bị điện tử di động.

[0085] Hệ thống máy tính 301 có thể bao gồm bộ phận xử lý trung tâm (CPU, trong bản mô tả này còn được gọi là “bộ xử lý” và “bộ xử lý máy tính”) 305, mà có thể là bộ xử lý một lõi hoặc nhiều lõi, hoặc nhiều bộ xử lý để xử lý song song. Hệ thống máy tính 301 còn có thể bao gồm bộ nhớ hoặc vị trí bộ nhớ 310 (ví dụ, bộ nhớ truy cập ngẫu nhiên, bộ nhớ chỉ để đọc, bộ nhớ cực nhanh), bộ phận lưu trữ điện tử 315 (ví dụ, ổ cứng), giao diện liên lạc 320 (ví dụ, bộ điều hợp mạng) để liên lạc với một hoặc nhiều hệ khác, và thiết bị ngoại vi 325, như khối bộ nhớ lưu trữ, bộ nhớ khác, lưu trữ dữ liệu và/hoặc bộ điều hợp màn hình điện tử. Bộ nhớ 310, bộ phận lưu trữ 315, giao diện 320 và thiết bị ngoại vi 325 có thể liên lạc với CPU 305 thông qua tuyến liên lạc (đường liên kết), như bản mạch in chính. Bộ phận lưu trữ 315 có thể là bộ phận lưu trữ dữ liệu (hoặc kho dữ liệu) để lưu dữ liệu. Hệ thống máy tính 301 có thể được liên hợp khi hoạt động với mạng lưới máy tính (“mạng lưới”) 330 với sự trợ giúp của giao diện liên lạc 320. Mạng lưới 330 có thể là hệ thống gồm các mạng máy tính được liên kết với nhau trên phạm vi toàn thế giới, hệ thống mạng máy tính toàn thế giới và/hoặc mạng nội bộ mở rộng, hoặc mạng nội bộ và/hoặc mạng nội bộ mở rộng mà liên lạc với hệ thống mạng máy tính toàn thế giới. Mạng lưới 330 trong một số trường hợp là mạng liên lạc truyền thông và/hoặc mạng dữ liệu. Mạng lưới 330 có thể bao gồm một hoặc nhiều máy tính chủ, mà có thể cho phép tính toán phân tán, như tính toán đám mây. Mạng lưới 330, trong một số trường hợp với sự trợ giúp của hệ thống máy tính 301, có thể thực thi mạng ngang hàng, mà có thể cho phép các thiết bị được liên hợp với hệ thống máy tính 301 vận hành như khách hoặc máy chủ.

[0086] CPU 305 có thể thực hiện chuỗi lệnh được bằng máy tính, mà có thể được bao gồm trong chương trình hoặc phần mềm. Các lệnh có thể được lưu giữ ở vị trí bộ nhớ, như bộ nhớ 310. Các lệnh có thể được hướng đến CPU 305, mà tiếp đó có thể lập trình hoặc tạo cấu hình theo cách khác CPU 305 để thực hiện các phương pháp theo sáng chế. Các ví dụ về các thao tác được thực hiện bởi CPU 305 có thể bao gồm tìm nạp, giải mã, thực hiện, và ghi lại.

[0087] CPU 305 có thể là một phần của mạch, như mạch tích hợp. Một hoặc nhiều thành phần khác của hệ thống 301 có thể được đưa vào mạch này. Trong một số trường hợp, mạch là mạch tích hợp ứng dụng riêng (ASIC).

[0088] Bộ lưu trữ 315 có thể lưu giữ các tệp tin, như ổ, thư viện và chương trình đã lưu. Bộ phận lưu trữ 315 có thể lưu giữ dữ liệu của người dùng, ví dụ, các lựa chọn của người dùng và chương trình của người dùng. Trong một số trường hợp, hệ thống máy tính 301 có thể bao gồm

một hoặc nhiều bộ phận lưu trữ dữ liệu bổ sung mà ở ngoài hệ thống máy tính 301, như nằm trên máy chủ từ xa mà liên lạc với hệ thống máy tính 301 thông qua mạng nội bộ hoặc hệ thống mạng máy tính toàn thế giới.

[0089] Hệ thống máy tính 301 có thể liên lạc với một hoặc nhiều hệ thống máy tính từ xa thông qua mạng lưới 330. Ví dụ, hệ thống máy tính 301 có thể liên lạc với hệ thống máy tính từ xa của người dùng. Các ví dụ về hệ thống máy tính từ xa bao gồm máy tính cá nhân (ví dụ, máy tính cá nhân xách tay), máy tính cá nhân dạng bảng dùng bút hoặc máy tính bảng (ví dụ, Apple® iPad, Samsung® Galaxy Tab), điện thoại, điện thoại thông minh (ví dụ, táo® iPhone, thiết bị cho phép điều hành bằng Android, Blackberry®), hoặc thiết bị hỗ trợ cá nhân kỹ thuật số. Người dùng có thể truy cập hệ thống máy tính 301 thông qua mạng lưới 330.

[0090] Các phương pháp như được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thực hiện bằng máy móc (ví dụ, bộ xử lý máy tính) thực thi mã được lưu giữ trên vị trí lưu trữ điện tử của hệ thống máy tính 301, ví dụ, trên bộ nhớ 310 hoặc bộ phận lưu trữ điện tử 315. Mã thực thi được hoặc đọc được bằng máy có thể được cung cấp ở dạng phần mềm. Trong quá trình sử dụng, mã được thực thi bằng bộ xử lý 305. Trong một số trường hợp, mã có thể nhận được từ bộ phận lưu trữ 315 và lưu trữ trên bộ nhớ 310 để bộ xử lý 305 dễ dàng truy cập được. Trong một số tình huống, bộ phận lưu trữ điện tử 315 có thể được loại trừ, và các lệnh thực thi được bằng máy được lưu trữ trên bộ nhớ 310.

[0091] Mã có thể được biên dịch trước và được tạo cấu hình để sử dụng với máy có bộ xử lý đã được làm thích ứng để thực thi mã, hoặc có thể được biên dịch trong thời gian hoạt động. Mã có thể được cấp theo ngôn ngữ lập trình mà có thể được chọn lọc để cho phép mã thực thi theo cách đã biên dịch trước hoặc được biên dịch.

[0092] Các khía cạnh của các hệ thống và các phương pháp theo sáng chế, như hệ thống máy tính 301, có thể được bao gồm trong lập trình. Các khía cạnh khác nhau của công nghệ có thể được xem là “sản phẩm” hoặc “vật phẩm” thường ở dạng mã thực thi được bằng máy (hoặc bộ xử lý) và/hoặc dữ liệu kèm theo mà được mang trên hoặc được bao gồm vào một loại môi trường đọc được bằng máy. Mã thực thi được bằng máy có thể được lưu giữ trên bộ phận lưu trữ điện tử, như bộ nhớ (ví dụ, bộ nhớ chỉ để đọc, bộ nhớ truy cập ngẫu nhiên, bộ nhớ cực nhanh) hoặc ổ cứng. Môi trường kiểu “lưu giữ” có thể bao gồm bất kỳ hoặc toàn bộ bộ nhớ hữu hình của máy tính, bộ xử lý hoặc tương tự, hoặc các modul kèm theo của chúng, như các loại bộ nhớ bán dẫn khác nhau, đường dẫn băng, đường dẫn đĩa và tương tự, mà có thể mang lại lưu giữ không tạm thời tại thời điểm bất kỳ để lập trình phần mềm. Toàn bộ hoặc một phần của phần mềm có thể đôi khi được liên lạc thông qua mạng lưới máy tính toàn thế giới hoặc mạng lưới truyền thông liên lạc khác nhau. Ví dụ, liên lạc theo cách đó có thể cho phép tải phần mềm từ một máy tính

hoặc bộ xử lý sang máy tính khác hoặc bộ xử lý khác, ví dụ, từ máy chủ quản lý hoặc máy tính chủ sang nền tảng máy tính của máy chủ ứng dụng. Do đó, loại môi trường khác mà có thể mang các yếu tố phần mềm bao gồm các loại sóng quang, điện và điện từ, như được sử dụng qua các giao diện vật lý giữa các thiết bị cục bộ, thông qua mạng lưới dây và mạng lưới cáp quang và trên các loại liên kết trên không. Các yếu tố vật lý mà mang các sóng này, như kết nối dây hoặc kết nối không dây, kết nối quang học hoặc tương tự, cũng có thể được xem là môi trường mang phần mềm. Thuật ngữ “môi trường đọc được” bằng máy tính hoặc máy được dùng trong bản mô tả này, trừ khi giới hạn ở môi trường “lưu trữ” hữu hình không tạm thời, có nghĩa là môi trường bất kỳ mà tham gia vào cung cấp lệnh cho bộ xử lý thực thi.

[0093] Do đó, môi trường đọc được bằng máy, như mã thực thi được bằng máy tính, có thể có nhiều dạng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, môi trường lưu trữ hữu hình, môi trường sóng mang hoặc môi trường truyền vật lý. Môi trường lưu giữ ổn định bao gồm, ví dụ, đĩa quang hoặc đĩa từ, ví dụ, thiết bị bất kỳ trong số các thiết bị lưu trữ ở máy tính bất kỳ hoặc tương tự, như có thể được sử dụng để thực thi các cơ sở dữ liệu, v.v. được thể hiện trên các hình vẽ. Môi trường lưu giữ không ổn định bao gồm bộ nhớ động, ví dụ, bộ nhớ chính của như nền tảng máy tính. Môi trường truyền không ổn định bao gồm cáp đồng trục; dây đồng và sợi quang, kể cả các dây mà bao gồm tuyến trong hệ thống máy tính. Môi trường truyền sóng mang có thể ở dạng tín hiệu điện hoặc điện từ, hoặc sóng âm thanh hoặc sóng ánh sáng như các loại tạo ra trong liên lạc dữ liệu tần số vô tuyến (RF) và hồng ngoại (IR). Do đó, các dạng thông thường của môi trường đọc được bằng máy tính bao gồm, ví dụ: đĩa mềm, đĩa lưu động, ổ cứng, băng từ, phương tiện từ tính bất kỳ khác, CD-ROM, DVD hoặc DVD-ROM, phương tiện quang bất kỳ khác, cuộn giấy thẻ chữ, môi trường lưu giữ vật lý bất kỳ khác với các mô hình lỗ, RAM, ROM, PROM và EPROM, FLASH-EPROM, chip hoặc khay bộ nhớ bất kỳ khác, sóng mang vận chuyển dữ liệu hoặc lệnh, cáp hoặc kết nối vận chuyển sóng mang đó, hoặc môi trường bất kỳ khác mà từ đó máy tính có thể đọc mã lập trình và/hoặc dữ liệu. Nhiều dạng trong số các dạng vật ghi đọc được bằng máy tính này có thể tham gia vào việc mang một hoặc nhiều trình tự gồm một hoặc nhiều lệnh để bộ xử lý thực thi.

[0094] Hệ thống máy tính 301 có thể bao gồm hoặc liên lạc với màn hình điện tử 335 mà chứa giao diện với người dùng (UI) 340 để cung cấp tính năng sử dụng, ví dụ, khả năng chọn loài được quan tâm và gen được quan tâm từ các loài được quan tâm. Các ví dụ về UI bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giao diện đồ thị với người dùng (GUI) và giao diện trên cơ sở web với người dùng.

[0095] Hệ thống bất kỳ trong số các hệ thống máy tính nêu trong bản mô tả này có thể sử dụng số lượng thích hợp hệ thống phụ. Trong một số trường hợp, hệ thống máy tính bao gồm một thiết

bị máy tính, trong đó các hệ thống phụ có thể là các thành phần của thiết bị máy tính. Trong các trường hợp khác, hệ thống máy tính có thể bao gồm nhiều thiết bị máy tính, mỗi thiết bị là một hệ thống phụ, với các thành phần bên trong. Hệ thống máy tính có thể bao gồm máy tính để bàn, máy tính xách tay, máy tính bảng, điện thoại di động, thiết bị mang được, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

[0096] Các hệ thống phụ có thể được nối thông qua hệ bus. Các hệ thống phụ bổ sung có thể bao gồm máy in, bàn phím, (các) thiết bị lưu trữ, và màn hình, mà có thể được liên hợp với bộ điều hợp màn hình. Các thiết bị ngoại vi và thiết bị nhập vào/xuất ra (I/O), mà có thể liên hợp với mạch điều khiển I/O, có thể được kết nối với hệ thống máy tính nhờ số lượng kết nối bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như cổng nhập/xuất (I/O) (ví dụ, USB, FireWire®). Ví dụ, cổng I/O hoặc giao diện ngoài (ví dụ, ethernet, Wi-Fi, v.v.) có thể được dùng để kết nối hệ thống máy tính với mạng diện rộng như Internet, thiết bị nhập chuột, hoặc máy quét. Tương kết thông qua bus hệ thống có thể cho phép bộ xử lý trung tâm liên lạc với từng hệ thống phụ và kiểm soát việc thực thi nhiều lệnh từ bộ nhớ hệ thống hoặc (các) thiết bị lưu trữ (ví dụ, đĩa cố định, như đĩa cứng, hoặc đĩa quang), cũng như trao đổi thông tin giữa các hệ thống phụ. Bộ nhớ hệ thống và/hoặc (các) thiết bị lưu trữ có thể bao gồm vật ghi đọc được bằng máy tính. Hệ thống phụ khác có thể là thiết bị thu thập dữ liệu, như máy quay chụp, micro, gia tốc kế, và các loại tương tự. Dữ liệu bất kỳ trong số các dữ liệu đã nêu trong bản mô tả này có thể được xuất từ một thành phần sang thành phần khác và có thể được xuất cho người sử dụng.

[0097] Các khía cạnh theo các phương án có thể được thực hiện ở dạng điều khiển logic bằng cách sử dụng phần cứng (ví dụ, mạch tích hợp ứng dụng riêng hoặc vi mạch dùng cấu trúc mảng phần tử logic mà người dùng có thể lập trình được) và/hoặc bằng cách sử dụng phần mềm máy tính với bộ xử lý lập trình chung được theo kiểu môđun hoặc tích hợp. Thuật ngữ bộ xử lý được dùng trong bản mô tả này có thể bao gồm bộ xử lý một lõi, bộ xử lý nhiều lõi trên cùng một chip tích hợp, hoặc nhiều bộ phận xử lý trên một bảng mạch hoặc được nối mạng. Trên cơ sở bộc lộ và mô tả theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết và nhận thức được các cách khác và/hoặc các phương pháp khác để thực hiện các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này bằng cách sử dụng phần cứng và kết hợp phần cứng và phần mềm.

[0098] Thành phần bất kỳ trong số các thành phần phần mềm hoặc các chức năng đã được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thực hiện như mã phần mềm cần được thực thi bằng bộ xử lý bằng cách sử dụng ngôn ngữ máy tính phù hợp bất kỳ, ví dụ, Java, C, C++, C#, Objective-C, Swift, hoặc ngôn ngữ điều khiển như Perl hoặc Python bằng cách áp dụng, ví dụ, các kỹ thuật thông thường hoặc kỹ thuật định hướng theo đối tượng. Mã phần mềm có thể được lưu giữ ở

dạng một loạt lệnh hoặc chỉ lệnh trên vật ghi đọc được bằng máy tính để bảo quản và/hoặc truyền.

[0099] Một số thuật ngữ

[00100] Thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các trường hợp cụ thể và không nhằm giới hạn. Các thuật ngữ dưới đây được bàn luận để minh họa nghĩa của các thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này, ngoài cách hiểu các thuật ngữ này bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các dạng số ít “một” và “nó” được dùng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo bao gồm cả viện dẫn số nhiều trừ trường hợp quy định rõ ràng khác. Cần lưu ý rằng các điểm yêu cầu bảo hộ có thể được soạn thảo để loại trừ yếu tố tùy chọn bất kỳ. Như vậy, tuyên bố này nhằm để có tác dụng làm cơ sở viện dẫn nhằm sử dụng các thuật ngữ mang tính loại trừ như “chỉ” và dạng tương tự liên quan đến việc liệt kê các yếu tố của điểm yêu cầu bảo hộ, hoặc sử dụng giới hạn “phủ định”.

[00101] Một số khoảng được bộc lộ trong bản mô tả này bằng các trị số bằng số sau thuật ngữ “khoảng”. Thuật ngữ “khoảng” được dùng trong bản mô tả này để tạo ra sự hỗ trợ theo nghĩa đen về con số chính xác đứng sau, cũng như con số gần đúng hoặc xấp xỉ con số đứng sau thuật ngữ này. Khi xác định liệu một con số là gần bằng hoặc xấp xỉ một con số đã nêu cụ thể hay không, con số gần bằng hoặc xấp xỉ không nêu trước có thể là con số mà, trong trường hợp khi nó được thể hiện, tạo ra giá trị về cơ bản là tương đương con số đã nêu trước. Khi một khoảng trị số được nêu, thì cần phải hiểu rằng từng trị số ở giữa, đến một phần mười của đơn vị của giới hạn dưới trừ trường hợp quy định rõ ràng khác, giữa giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng đó và trị số bất kỳ khác được nêu hoặc trị số bất kỳ khác nằm giữa khoảng đã nêu này, được bao hàm trong phạm vi các phương pháp và các chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này. Các giới hạn trên và giới hạn dưới của các khoảng nhỏ hơn này có thể được đưa một cách độc lập vào các khoảng nhỏ hơn này và cũng được bao gồm trong phạm vi các phương pháp và các chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này, áp dụng giới hạn loại trừ cụ thể bất kỳ trong khoảng đã nêu này. Nếu khoảng đã nêu bao gồm một hoặc cả hai giới hạn, thì các khoảng loại trừ một hoặc cả hai trong số các giới hạn được bao gồm cũng được bao hàm trong phạm vi của các phương pháp và các chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này.

[00102] Các thuật ngữ “cá thể”, “bệnh nhân”, hoặc “đối tượng” có thể được sử dụng thay thế nhau. Không một thuật ngữ nào trong số các thuật ngữ này yêu cầu hoặc bị hạn chế ở tình huống đặc trưng bởi sự giám sát (ví dụ, liên tục hoặc gián đoạn) của nhân viên chăm sóc y tế (ví dụ, bác sỹ, y tá, y tá hành nghề, trợ lý bác sỹ, hộ lý, hoặc nhân viên nhà tế bần). Ngoài ra, các thuật ngữ này có thể chỉ đối tượng người hoặc đối tượng động vật.

[00103] Các thuật ngữ “việc điều trị” hoặc “điều trị” có thể chỉ cả các biện pháp chữa bệnh và các biện pháp dự phòng hoặc các biện pháp ngăn ngừa, trong đó mục đích có thể là ngăn ngừa hoặc làm chậm lại (làm giảm bớt) tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bệnh lý được hướng đích. Các đối tượng có nhu cầu điều trị có thể bao gồm các đối tượng đã mắc rối loạn này, cũng như các đối tượng dễ mắc rối loạn này, hoặc các đối tượng mà cần được phòng ngừa rối loạn này. Ví dụ, đối tượng (ví dụ, động vật có vú) có thể được “điều trị” khối u thành công, nếu, sau khi tiếp nhận điều trị, thì đối tượng thể hiện mức giảm quan sát được và/hoặc đo được hoặc không có một hoặc nhiều trong số dưới đây: giảm về số lượng tế bào ung thư hoặc không có tế bào ung thư; giảm về kích thước của khối u; ức chế (tức là làm chậm đến mức độ nhất định và tốt hơn nếu dùng) sự thâm nhiễm của tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại biên, kể cả mức độ lan rộng ung thư vào mô mềm và xương; ức chế (tức là làm chậm đến mức độ nhất định và tốt hơn nếu dùng) di căn khối u; ức chế, đến mức độ nhất định, sự sinh trưởng của khối u; và/hoặc giảm bớt đến mức độ nhất định một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến ung thư cụ thể; giảm tỷ lệ bệnh tật và/hoặc tử vong, và cải thiện chất lượng sống.

[00104] Các ví dụ dưới đây minh họa, mà không giới hạn, một số khía cạnh theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Xác định các yếu tố ảnh hưởng đến mức độ phát hiện ADN của EBV trong huyết tương ở đối tượng không có NPC

[00105] Các yếu tố mà có thể tác động đến tỷ lệ tích cực của ADN của EBV trong huyết tương ở người tham gia không mắc NPC được khảo sát. Nhóm này bao gồm đối tượng có thể tiếp tục theo đuổi thử nghiệm tiếp theo và là các ca sàng lọc dương tính giả trong phạm vi sàng lọc NPC. Việc xác định các yếu tố mà liên quan đến ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ở đối tượng không có NPC có thể được dùng để làm giảm số lượng của kết quả sàng lọc dương tính giả.

[00106] Theo thử nghiệm này, 20.138 người tham gia (nam giới, 40 tuổi đến 62 tuổi) mà ghi danh vào nghiên cứu sàng lọc NPC nhưng không có NPC trong vòng 3 năm sau khi sàng lọc được phân tích. Dữ liệu nhân khẩu học của họ, các bệnh kèm theo, cũng như nhiệt độ môi trường trung bình vào ngày sàng lọc, được phân tích. Nhiệt độ môi trường thu được từ đài quan sát Hong Kong (Hong Kong Observatory). Trước hết, phân tích đơn biến được thực hiện và tiếp theo là hồi quy hàm logit đa biến để xác định các yếu tố liên quan một cách độc lập đến ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được.

[00107] Phân tích đơn biến được thực hiện để nghiên cứu các tác động của từng yếu tố đến khả năng phát hiện ADN của EBV trong huyết tương. Các yếu tố được thử nghiệm riêng rẽ là lứa

tuổi, tình trạng hút thuốc hiện tại, tình trạng dùng đồ uống có cồn hiện tại, thói quen tập thể dục, tình trạng bệnh đái tháo đường, tình trạng cao huyết áp, tình trạng tăng mỡ máu, và bệnh tim thiếu máu cục bộ.

[00108] Có mối tương quan đồng biến giữa lứa tuổi và ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ($P < 0,001$, $R = 0,651$, hồi quy tuyến tính; xem Hình 1). Mỗi khoảng tăng 5 năm tuổi liên quan đến mức tăng 0,6% về mức độ dương của ADN của EBV trong huyết tương.

[00109] Có quan hệ đáng kể về mặt thống kê giữa tình trạng hút thuốc hiện tại và ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ($P < 0,001$, thử nghiệm Chi bình phương; **Bảng 1**). Tỷ lệ chênh là 1,48.

Bảng 1. Số cá thể có ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được và phát hiện được trên cơ sở tình trạng hút thuốc hiện tại

	Đối tượng hiện hút thuốc	Đối tượng hiện không hút thuốc
ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được	3748	15312
ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được	286	792

[00110] Không có quan hệ đáng kể về mặt thống kê giữa mức độ tiêu thụ đồ uống có cồn và ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ($P = 0,9086$, thử nghiệm Chi bình phương; **Bảng 2**).

Bảng 2. Số cá thể với ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được và phát hiện được trên cơ sở tình trạng dùng đồ uống có cồn hiện tại

	Đối tượng hiện dùng đồ uống có cồn	Đối tượng hiện không dùng đồ uống có cồn
ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được	12761	6299
ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được	720	358

[00111] Không có mối tương quan giữa thói quen tập thể dục và ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ($P = 0,7441$, thử nghiệm Chi bình phương; **Bảng 3**). Tập thể dục thường xuyên được xác định là tập thể dục ít nhất là 30 phút ở mức độ trung bình ít nhất là hai ngày mỗi tuần.

Bảng 3. Số cá thể với ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được và phát hiện được trên cơ sở thói quen tập thể dục

	Tập thể dục thường xuyên	Không tập thể dục thường xuyên
ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được	13375	5683
ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được	751	327

[00112] Có tác dụng đáng kể về mặt thống kê giữa bệnh đái tháo đường và ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ($P = 0,012$, thử nghiệm Chi bình phương; Bảng 4).

Bảng 4. Số cá thể có ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được và phát hiện được trên cơ sở tình trạng của bệnh đái tháo đường

	Không mắc bệnh đái tháo đường	Mắc bệnh đái tháo đường
ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được	17929	1131
ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được	993	85

[00113] Có mối quan hệ đáng kể về mặt thống kê giữa cao huyết áp và ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ($P = 0,009$, thử nghiệm Chi bình phương; Bảng 5).

Bảng 5. Số cá thể có ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được và phát hiện được trên cơ sở tình trạng cao huyết áp

	Không có chứng tăng huyết áp	Có chứng tăng huyết áp
ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được	17929	1131
ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được	993	85

[00114] Không có quan hệ đáng kể về mặt thống kê giữa hiện tượng tăng mỡ máu và ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ($P = 0,18$, thử nghiệm Chi bình phương; Bảng 6).

Bảng 6. Số cá thể có ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được và phát hiện được trên cơ sở tình trạng tăng mỡ máu

	Không tăng mỡ máu	Tăng mỡ máu
ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được	16788	2272
ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được	935	143

[00115] Không có quan hệ đáng kể về mặt thống kê giữa bệnh tim thiếu máu cục bộ và ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ($P = 0,06$, thử nghiệm Chi bình phương; Bảng 7).

Bảng 7. Số cá thể có ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được và phát hiện được trên cơ sở tình trạng bệnh tim thiếu máu cục bộ

	Không mắc bệnh tim thiếu máu cục bộ	Mắc bệnh tim thiếu máu cục bộ
ADN của EBV trong huyết tương không phát hiện được	18503	557
ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được	1035	43

[00116] Có mối tương quan nghịch biến giữa nhiệt độ và ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ($P < 0,001$, $R = 0,651$, hồi quy tuyến tính; Hình 2). Mức giảm 5°C nhiệt độ môi trường trung bình liên quan đến mức tăng 0,85% mức độ dương của ADN của EBV trong huyết tương.

[00117] Để khảo sát tiếp liệu các yếu tố này có liên quan một cách độc lập đến ADN của EBV phát hiện được trong huyết tương hay không, phân tích hồi quy hàm logit đa biến được thực hiện.

[00118] Trong phân tích hồi quy hàm logit đa biến, chỉ lứa tuổi, tình trạng hút thuốc hiện tại và nhiệt độ môi trường liên quan một cách độc lập đến mức phát hiện gia tăng của ADN của EBV trong huyết tương (Bảng 8). Tác động của bệnh đái tháo đường và cao huyết áp đến ADN của EBV trong huyết tương dễ bị nhầm lẫn với lứa tuổi vì hai tình trạng bệnh lý này phổ biến hơn ở nhóm cao tuổi. Dựa trên phân tích đa biến, các đối tượng hút thuốc lá có nguy cơ có ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được cao hơn 1,59 lần so với các đối tượng không hút thuốc lá.

Bảng 8. Hồi quy hàm logit đa biến đối với các yếu tố ảnh hưởng đến mức độ phát hiện ADN của EBV trong huyết tương ở đối tượng không mắc NPC

	Hệ số hồi quy	Sai số chuẩn	Trị số p
Lứa tuổi	0,033	0,005	<0,001
Tình trạng hút thuốc hiện tại	0,463	0,072	<0,001
Nhiệt độ môi trường	-0,022	0,006	<0,001
Bệnh đái tháo đường	0,152	0,121	0,207
Huyết áp cao	0,096	0,082	0,243

[00119] Mức tăng về mức độ dương của ADN của EBV trong huyết tương ở đối tượng không có NPC rất có khả năng là do có hiện tượng sao chép virus trong thời gian ngắn. Trong phạm vi sàng lọc NPC, sự có mặt của ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ở đối tượng không có NPC có thể biểu thị kết quả sàng lọc dương tính giả và có thể cần khảo sát nội soi mũi và MRI. Do đó, hiện tượng giảm tỷ lệ phát hiện ADN của EBV trong huyết tương ở đối tượng không có NPC có thể gia tăng hiệu quả chi phí của chương trình sàng lọc. Xem tài liệu: Chan *et al.* (2018) *Ambient Temperature and Screening for Nasopharyngeal Cancer. NEJM* 378: 962-963).

Ví dụ 2. Phát hiện EBV trong huyết tương

[00120] Mẫu huyết tương được lấy từ một phụ nữ 60 tuổi có thói quen hút thuốc lá nghi có ung thư mũi hầu biểu mô (NPC). Nồng độ ADN của EBV ở mẫu huyết tương được đo bằng cách áp dụng PCR thời gian thực định lượng (qPCR) đối với vùng BamHI-W của hệ gen EBV. PCR thời gian thực định lượng đối với gen β -globin cũng được thực hiện để dùng làm đối chứng. Ba lần lặp lại của từng phản ứng qPCR được thực hiện. Đường cong định cỡ được chạy song song với từng qPCR bằng cách sử dụng ADN từ dòng tế bào dương tính EBV làm chuẩn. Nồng độ của

ADN của EBV trong huyết tương được xác định và được biểu hiện theo số lượng bản sao của hệ gen EBV trong mỗi mililit của huyết tương.

[00121] Mức ngưỡng cơ bản ADN của EBV trong huyết tương được đặt ở mức 100.000 bản sao/ml. Tuy nhiên, vì người phụ nữ đó là người hút thuốc lá, nên ngưỡng được đặt cao hơn 10%, đến 110.000 bản sao/ml. Lượng ADN của EBV trong huyết tương phát hiện được ở người phụ nữ là 100.500 bản sao/ml. Do lượng này thấp hơn ngưỡng đã được điều chỉnh, nên người phụ nữ này không bị nghi có NPC và không thực hiện tiếp sàng lọc.

[00122] Trong khi các phương án được ưu tiên của sáng chế đã được thể hiện và bộc lộ trong bản mô tả này, điều hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là các phương án được nêu chỉ nhằm mục đích làm ví dụ. Nhiều biến đổi, thay đổi, và thay thế sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nghĩ đến mà không chệch khỏi tinh thần của sáng chế. Cần phải hiểu rằng các phương án lựa chọn khác nhau đối với các phương án của sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng khi thực hiện sáng chế. Dự định rằng các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây xác định phạm vi của sáng chế và các phương pháp và các cấu trúc nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ này và các phương án tương đương của chúng sẽ được bao trùm.

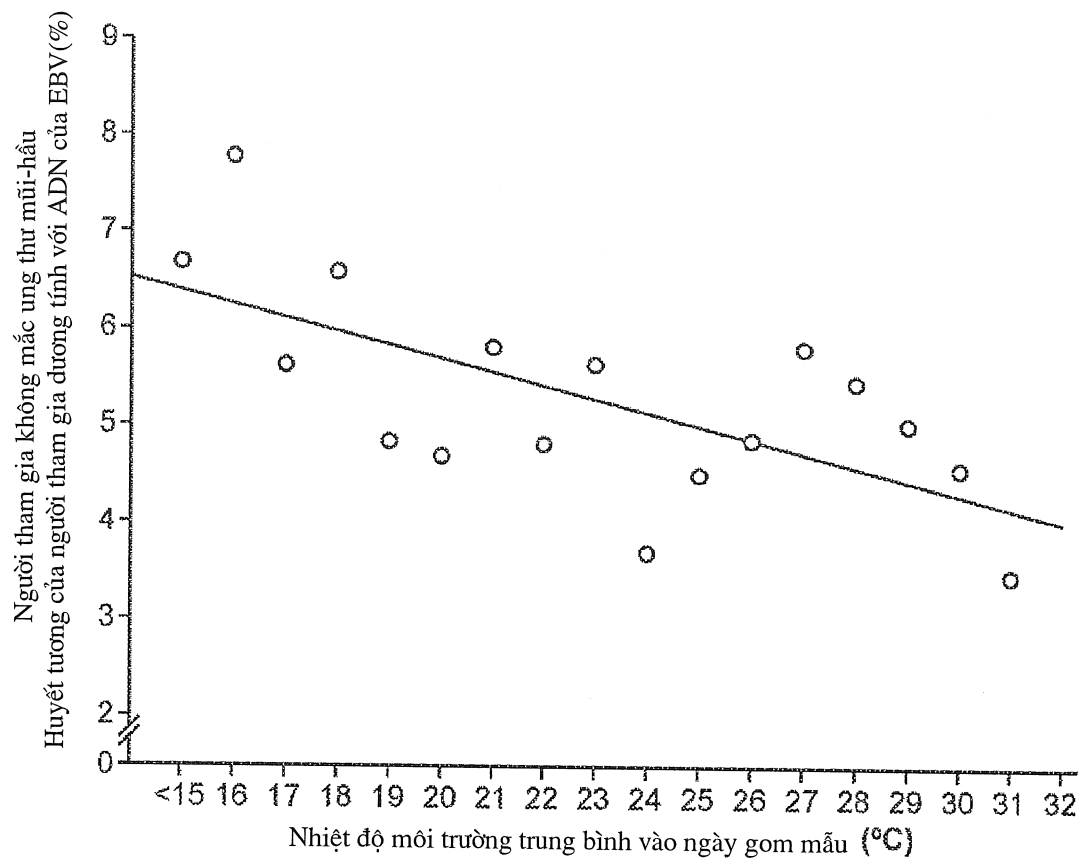
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân tích mẫu từ đối tượng về sự có mặt của axit nucleic ngoài tế bào của virut Epstein-Barr (EBV) từ tế bào ung thư, phương pháp bao gồm bước:
 - a) xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ virut Epstein-Barr (EBV) trong mẫu sinh học từ đối tượng; và
 - b) so sánh lượng axit nucleic ngoài tế bào từ EBV với ngưỡng đã được điều chỉnh mà là cao hơn ngưỡng cơ bản đã được xác định trước;trong đó:
 - (i) đối tượng ở lứa tuổi trên lứa tuổi cơ bản,
 - (ii) đối tượng là người hút thuốc, hoặc
 - (iii) nhiệt độ trung bình của môi trường xung quanh vào ngày mẫu sinh học được gom tại địa điểm trong phạm vi 50km từ địa điểm là thấp hơn nhiệt độ cơ bản;trong đó ngưỡng cơ bản đã xác định trước là lượng ngưỡng của axit nucleic ngoài tế bào EBV mà là chỉ báo về sự có mặt của axit nucleic ngoài tế bào EBV từ tế bào ung thư ở mẫu đối với quần thể tham chiếu bao gồm đối tượng tham chiếu (i) ở lứa tuổi cơ bản hoặc trẻ hơn, (ii) không hút thuốc, (iii) cung cấp mẫu sinh học tham chiếu, và (iv) có tình trạng ung thư đã biết;
- trong đó nhiệt độ trung bình của môi trường xung quanh vào ngày một hoặc nhiều mẫu sinh học tham chiếu được gom tại địa điểm trong phạm vi 50km từ địa điểm mà một hoặc nhiều mẫu sinh học tham chiếu tương ứng được gom là nhiệt độ cơ bản hoặc cao hơn;
- trong đó tế bào ung thư là tế bào ung thư mũi hầu; và
- trong đó các đối tượng tham chiếu có tình trạng ung thư bao gồm đối tượng tham chiếu thứ nhất có ung thư mũi hầu và đối tượng tham chiếu thứ hai không có ung thư mũi hầu,
- nhờ đó phân tích mẫu về sự có mặt của axit nucleic ngoài tế bào EBV từ tế bào ung thư.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đối tượng là người hút thuốc.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ngưỡng đã điều chỉnh được thiết lập cao hơn khi đối tượng không là người hút thuốc.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lứa tuổi của đối tượng là cao hơn lứa tuổi cơ bản.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó ngưỡng đã điều chỉnh bao gồm mối tương quan thuận với lứa tuổi của đối tượng.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ môi trường trung bình vào ngày mẫu sinh học được gom tại địa điểm trong phạm vi 50km từ địa điểm sưu tập là thấp hơn nhiệt độ cơ bản.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó ngưỡng đã điều chỉnh là tương quan nghịch với nhiệt độ môi trường trung bình.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ cơ bản là 30°C.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lứa tuổi cơ bản là 45 tuổi.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lứa tuổi của đối tượng là cao hơn lứa tuổi cơ bản và đối tượng là người hút thuốc.
11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lứa tuổi của đối tượng là cao hơn lứa tuổi cơ bản và nhiệt độ môi trường trung bình vào ngày mẫu sinh học được gom tại địa điểm trong khoảng 50km từ địa điểm gom là thấp hơn nhiệt độ cơ bản.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đối tượng là người hút thuốc và nhiệt độ môi trường trung bình vào ngày mẫu sinh học được gom tại địa điểm trong phạm vi 50km từ địa điểm gom là thấp hơn nhiệt độ cơ bản.
13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lứa tuổi của đối tượng là cao hơn lứa tuổi cơ bản, đối tượng là người hút thuốc, và nhiệt độ môi trường trung bình vào ngày mẫu sinh học được gom tại địa điểm trong phạm vi 50km từ địa điểm sưu tập là thấp hơn nhiệt độ cơ bản.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ngưỡng đã điều chỉnh không được xác định trên cơ sở liệu đối tượng mắc bệnh đái tháo đường, tiêu thụ đồ uống có cồn, tập thể dục, mắc chứng tăng huyết áp, bị tăng mỡ máu, hoặc mắc bệnh tim thiếu máu cục bộ hay không.
15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc so sánh lượng axit nucleic ngoài tế bào từ EBV với ngưỡng đã điều chỉnh làm giảm tỷ lệ dương tính giả của sàng lọc so với việc so sánh lượng axit nucleic ngoài tế bào với ngưỡng cơ bản.
16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lượng chứa nhiều bản sao của axit nucleic ngoài tế bào từ EBV trong mỗi mililit (số bản sao/ml).
17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp còn bao gồm việc thực hiện phân tích thứ hai để phát hiện sự có mặt của axit nucleic ngoài tế bào EBV từ tế bào ung thư nếu lượng axit nucleic ngoài tế bào từ EBV ở mẫu sinh học này cao hơn ngưỡng đã điều chỉnh.
18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó phân tích thứ hai bao gồm việc xác định kích cỡ axit nucleic ngoài tế bào từ EBV ở mẫu sinh học thứ hai.
19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó mẫu sinh học thứ hai là đồng nhất với mẫu sinh học.
20. Phương pháp theo điểm 18, trong đó mẫu sinh học thứ hai là khác mẫu sinh học.

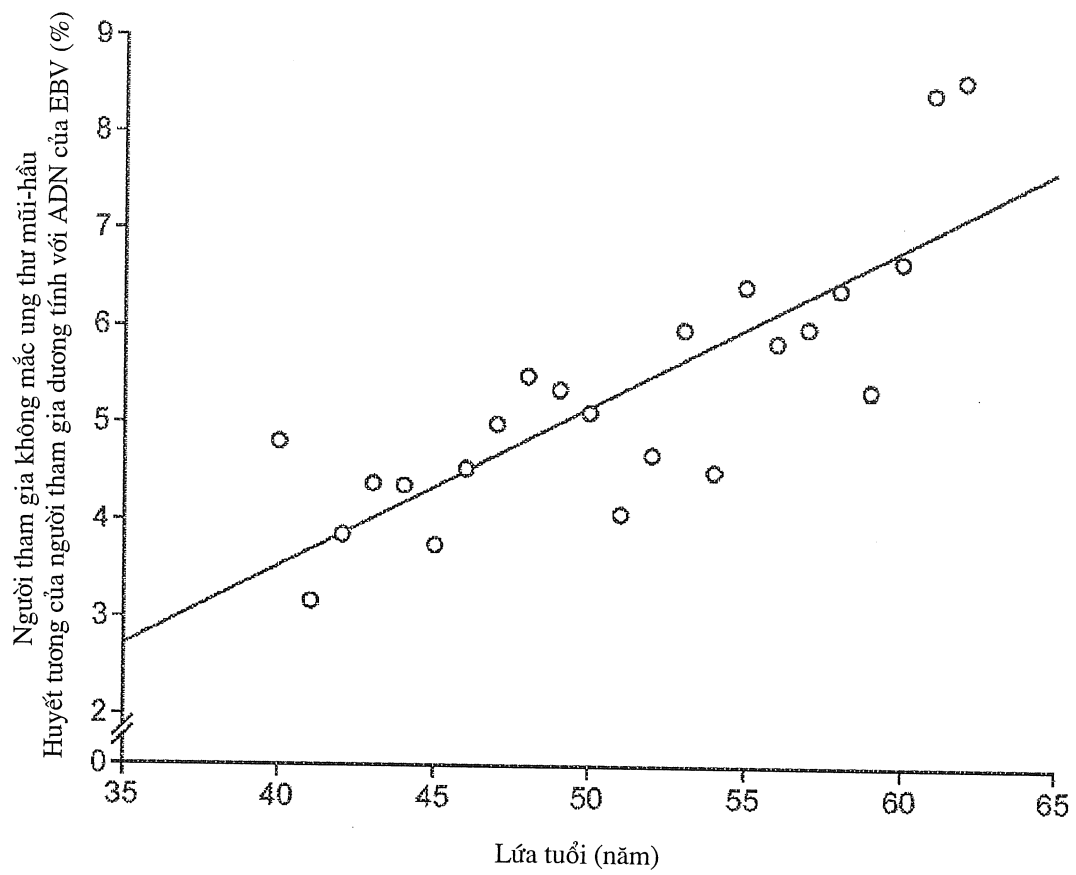
21. Phương pháp theo điểm 18, trong đó phân tích thứ hai bao gồm việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào từ mẫu sinh học thứ hai từ đối tượng mà là từ EBV và có kích cỡ trong khoảng nhất định.
22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó việc xác định lượng axit nucleic ngoài tế bào mà là từ EBV và có kích cỡ trong khoảng nhất định bao gồm việc giải trình tự song song với số lượng lớn axit nucleic ngoài tế bào ở mẫu sinh học thứ hai để tạo ra kết quả đọc trình tự.
23. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mẫu sinh học chứa huyết tương hoặc huyết thanh.
24. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc xác định lượng bao gồm bước khuếch đại axit nucleic ngoài tế bào.
25. Phương pháp theo điểm 24, trong đó bước khuếch đại bao gồm phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).
26. Phương pháp theo điểm 25, trong đó PCR bao gồm PCR định lượng (qPCR).
27. Sản phẩm máy tính bao gồm vật ghi đọc được bằng máy tính lưu nhiều lệnh để kiểm soát hệ thống máy tính để thực hiện các thao tác của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26.
28. Hệ thống bao gồm sản phẩm máy tính theo điểm 27 và một hoặc nhiều bộ xử lý để thực hiện các lệnh lưu trên vật ghi đọc được bằng máy tính.

1 / 5



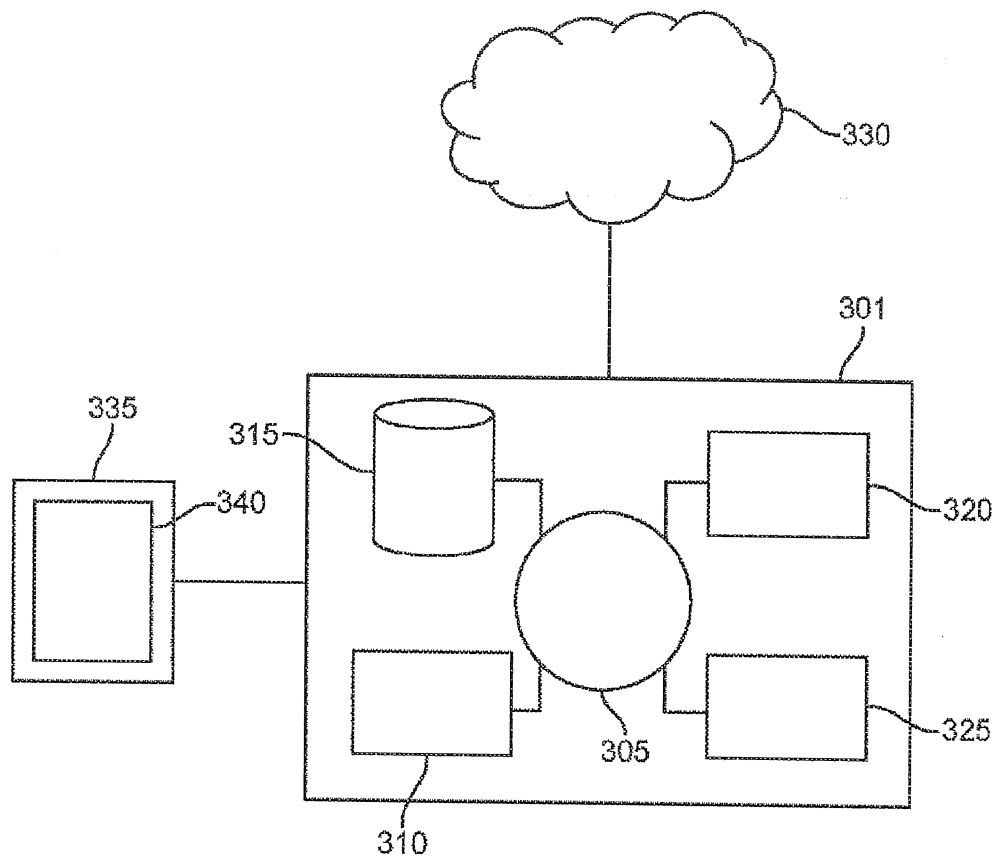
Hình 1

2 / 5



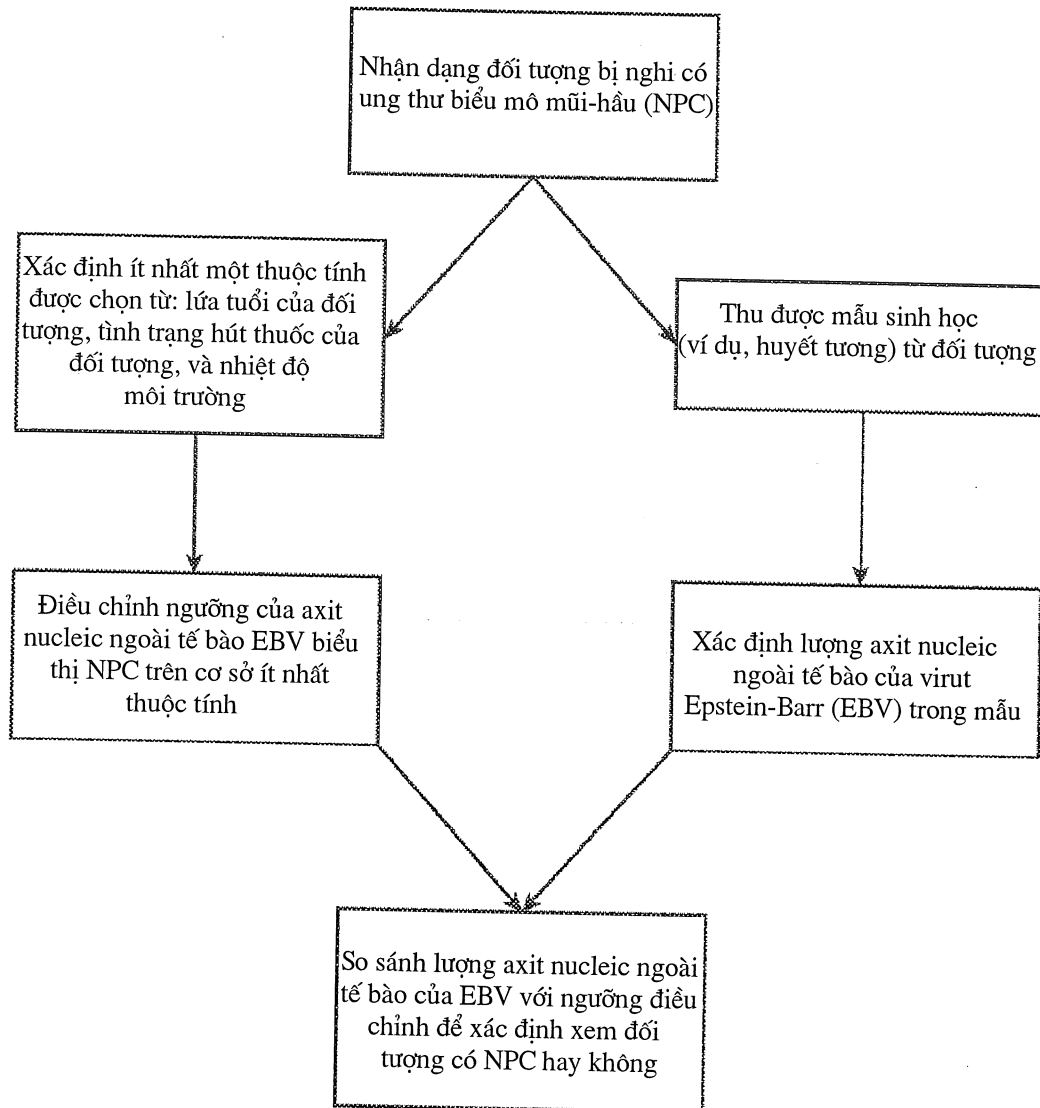
Hình 2

3 / 5



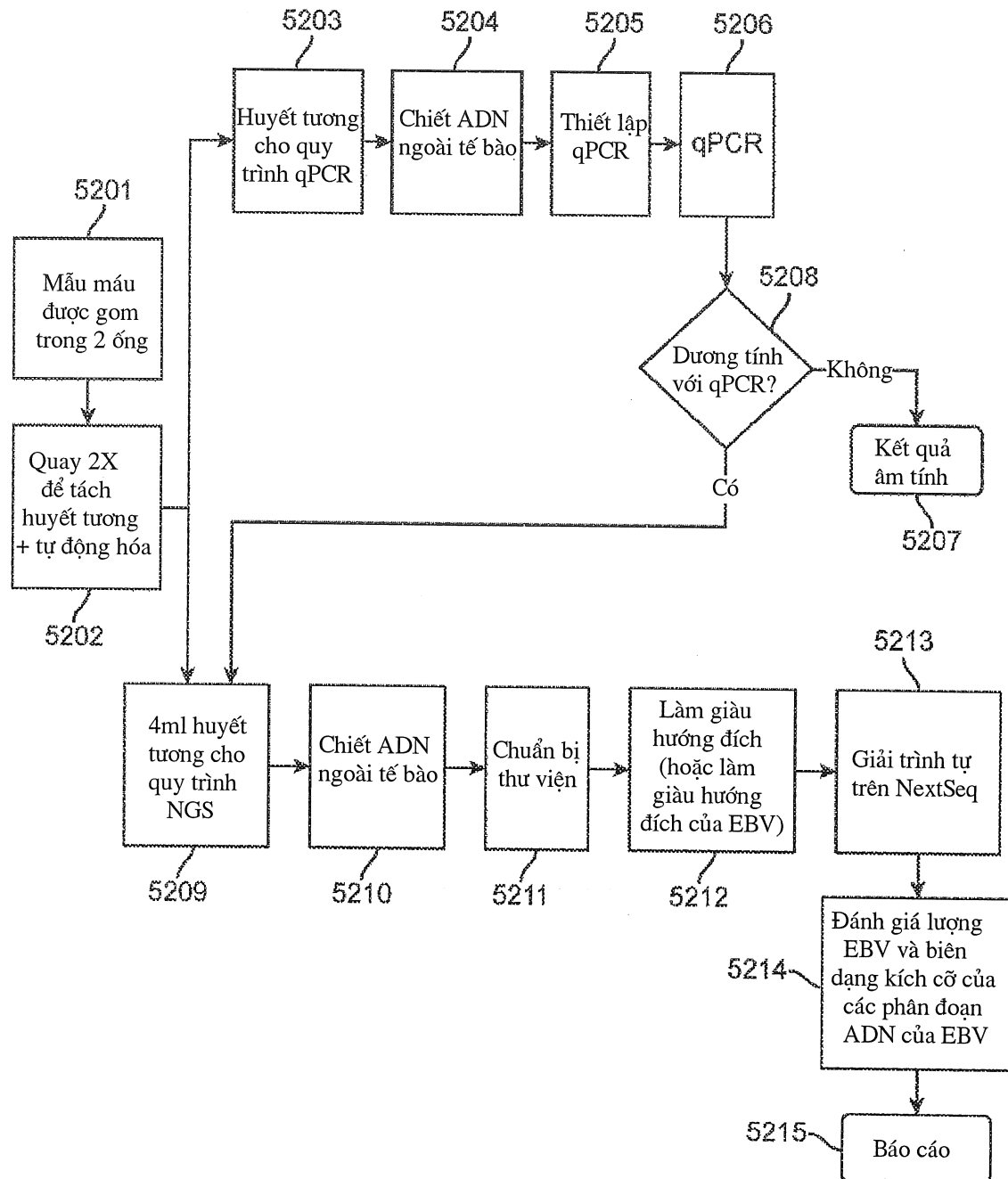
Hình 3

4 / 5



Hình 4

5 / 5



Hình 5