



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0044224
(51)⁷ G01N 33/50; G01N 33/569; G01N 33/92; G01N 33/543 (13) B

(21) 1-2017-03013 (22) 04/01/2016
(86) PCT/NL2016/050002 04/01/2016 (87) WO/2016/111619 14/07/2016
(30) 2014085 05/01/2015 NL; 2015553 02/10/2015 NL
(45) 25/03/2025 444 (43) 27/11/2017 356A
(71) 1. KEI INTERNATIONAL LIMITED (CN)
805-6 Prosperity Millennia Plaza, 663 King's Road, North Point Hong Kong, Hong Kong
2. TOMORROWS IP LIMITED (CN)
805-6 Prosperity Millennia Plaza, 663 King's Road, North Point Hong Kong, Hong Kong
(72) CASTROP, Johannes Theodorus (NL).
(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP TIỀN XỬ LÝ MẪU VÀ HỆ THỐNG PHÁT HIỆN DẤU HIỆU BỆNH LAO ĐANG HOẠT ĐỘNG

(21) 1-2017-03013

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp và hệ thống phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động. Hệ thống theo sáng chế được dùng để thực hiện phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động, phương pháp để tiên xử lý dòng mẫu từ người và động vật nghi ngờ mắc bệnh lao đang hoạt động, hệ thống dùng để tiên xử lý dòng mẫu từ người và động vật nghi ngờ mắc bệnh lao đang hoạt động và bộ kit để thực hiện các phương pháp trên.

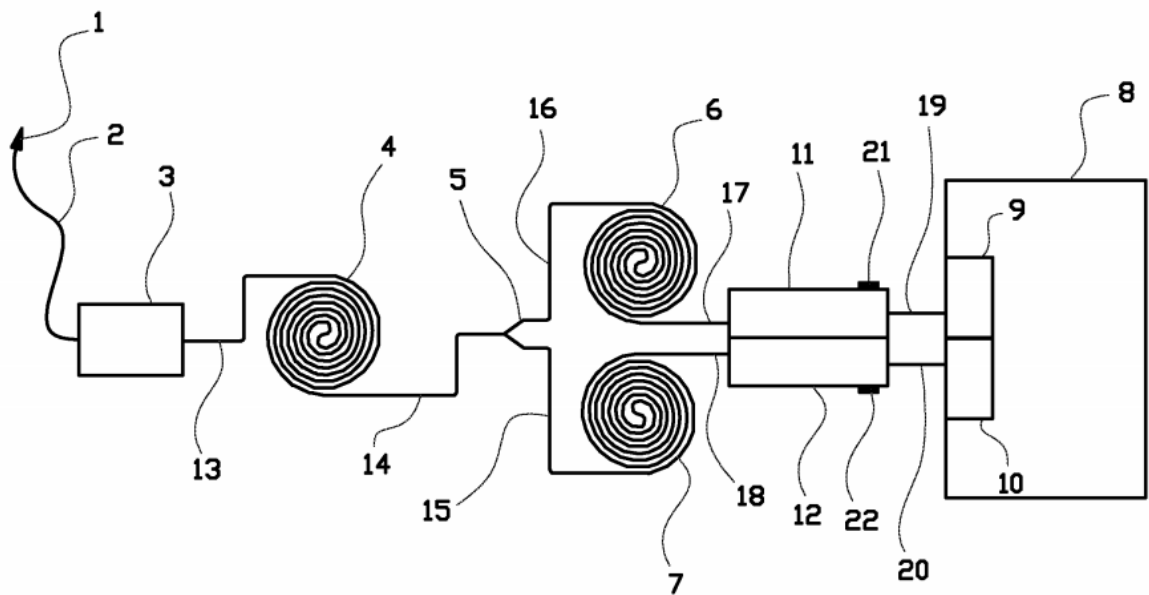


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tiên xử lý mẫu để phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động, và hệ thống xét nghiệm xách tay để thực hiện phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến hệ thống để thực hiện phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động, phương pháp tiên xử lý mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính, và hệ thống tiên xử lý dòng mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính và bộ dụng cụ (kit) để sử dụng trong các phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mycobacterium tuberculosis là loài vi khuẩn gây bệnh thuộc họ Mycobacteriaceae và là tác nhân gây bệnh của hầu hết các trường hợp bệnh lao (TB-tuberculosis).

Có khoảng chín triệu người bị nhiễm bệnh lao vào năm 2013, trong đó có 1,5 triệu ca nhiễm HIV. Năm 2013, 1,5 triệu người đã chết do nhiễm lao và có 360.000 người trong số đo dương tính với HIV. TB là một trong ba bệnh gây tử vong ở phụ nữ nhiều nhất trên toàn thế giới. Đã có 510.000 phụ nữ chết vì bệnh lao vào năm 2013. Trong số những người chết vì bệnh lao do dương tính với HIV thì có đến 50% là phụ nữ. Có ít nhất 550.000 trẻ em bị bệnh lao và ước tính có khoảng 80.000 trẻ em âm tính với HIV chết vì bệnh lao vào năm 2013. Trên toàn cầu vào năm 2013, ước tính có khoảng 480.000 người đã phát triển bệnh lao đa kháng thuốc (MDR-TB) và ước tính có khoảng 210.000 người tử vong do MDR-TB. Vào cuối năm 2013, có khoảng 100 quốc gia báo cáo rằng có ít nhất có một trường hợp bệnh lao siêu kháng thuốc (XDR-TB). Trung bình, có khoảng 9% trong các ca nhiễm MDR-TB là nhiễm XDR-TB.

Vì vậy, cách thức để chẩn đoán bệnh lao một cách nhanh chóng và tin cậy là rất quan trọng.

Một số phương pháp chẩn đoán bệnh lao đã được phát triển, nhưng tất cả các phương pháp đều có những hạn chế. Chẩn đoán bệnh lao đang hoạt động chỉ dựa trên dấu hiệu và triệu chứng là rất khó, nhất là chẩn đoán bệnh ở những người bị ức chế miễn dịch. Xét nghiệm TB qua da (còn được gọi là xét nghiệm qua da Mantoux sử dụng tuberculin), xét nghiệm TB qua máu (còn gọi là phân tích sự tiết interferon-gamma hay IGRAs), hoặc chụp X quang phổi (X-ray) và xét nghiệm phát hiện vi khuẩn lao kháng axit (AFB) trong đờm, chỉ ra những người bị nhiễm bệnh trong một vài ngày. Chẩn đoán chính xác bệnh lao được thực hiện bằng cách xác định *M. tuberculosis* trong một mẫu bệnh phẩm (cụ thể như đờm, mủ, hoặc sinh thiết mô). Tuy nhiên, quá trình nuôi cấy khó khăn do sự sinh trưởng chậm của vi khuẩn, có thể mất từ hai đến sáu tuần để nuôi cấy mẫu máu hoặc đờm nghi ngờ nhiễm bệnh.

Con người hoặc động vật bị nhiễm *M. tuberculosis* thường sinh kháng thể trực tiếp chống lại Mycobacterium. Sự hiện diện của những kháng thể này trong mẫu lấy từ những người bị nhiễm bệnh cho thấy sự nhiễm khuẩn ở những người đó. Sáng chế WO 2005/116654 mô tả phương pháp dựa trên nguyên tắc này và đề cập đến việc phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động. Phương pháp của WO 2005/116654 bao gồm lấy mẫu lần thứ nhất, thứ hai và thứ ba từ một người bị nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính, pha loãng mẫu thứ nhất và phơi nhiễm một phần mẫu với kháng nguyên axit mycolic được cố định trong ống xét nghiệm và một phần mẫu với kháng nguyên axit mycolic được cố định trong ống đối chứng. Mẫu thứ hai được phơi nhiễm với các hạt mỡ (liposom) có chứa kháng nguyên axit mycolic và mẫu thứ ba được phơi nhiễm với liposom không chứa các kháng nguyên axit mycolic. Mẫu thứ hai được thêm vào ống xét nghiệm và mẫu thứ ba được thêm vào ống đối chứng và đã phát hiện các kháng thể kháng với axit mycolic và kháng nguyên trong cả ống xét nghiệm và đối chứng. Mức độ liên kết kháng nguyên kháng thể được so sánh giữa ống xét nghiệm và ống đối chứng. Liên kết kháng nguyên kháng thể trong ống xét nghiệm ít hơn so với ống đối chứng cho thấy sự hiện diện của các kháng thể đối với kháng nguyên axit mycolic trong mẫu.

Sáng chế WO 2013/186679 đề cập đến phương pháp phát hiện chỉ thị sinh học kháng thể đặc hiệu kháng nguyên để chẩn đoán bệnh lao đang hoạt động, phương

pháp bao gồm các bước: chuẩn bị chế phẩm liposom chứa chất trình diện kháng nguyên của lipit, là chế phẩm mà thành phần liposom của nó chứa lipit sterol cải biến và chất lipit tinh khiết từ thành tế bào vi khuẩn lao hoặc dẫn xuất hoặc chất tương tự; cố định liposom để tạo ra các kháng nguyên axit mycolic cố định chứa chất lipit tinh sạch từ thành tế bào vi khuẩn lao hoặc dẫn xuất hoặc chất tương tự; lấy mẫu lần thứ nhất, thứ hai và thứ ba từ người hoặc động vật bị nghi ngờ mắc bệnh lao đang hoạt động, trong đó mỗi mẫu có thể chứa các kháng thể kháng kháng nguyên. Mẫu thứ nhất có nồng độ thấp hơn do đã được pha loãng hơn so với mẫu thứ hai và thứ ba. Phơi nhiễm một phần của mẫu thứ nhất với kháng nguyên axit mycolic cố định trong ống xét nghiệm và phơi nhiễm một phần của mẫu thứ nhất với kháng nguyên axit mycolic cố định trong ống đối chứng. Phơi nhiễm mẫu thứ hai với chế phẩm liposom chứa chất trình diện kháng nguyên của lipit đã được chuẩn bị ở bước thứ nhất; phơi nhiễm mẫu thứ ba với liposom không chứa kháng nguyên axit mycolic; thêm mẫu thứ hai vào ống xét nghiệm để phơi nhiễm với chế phẩm liposom chứa kháng nguyên axit mycolic đã được chuẩn bị ở bước một; thêm mẫu thứ ba vào ống đối chứng để phơi nhiễm với các liposom không chứa axit mycolic. Phát hiện liên kết của kháng thể đối với kháng nguyên axit mycolic trong cả hai ống xét nghiệm và đối chứng trong thời gian thực và so sánh mức độ liên kết kháng nguyên kháng thể giữa ống xét nghiệm và ống đối chứng. Liên kết kháng nguyên kháng thể trong ống xét nghiệm ít hơn so với ống đối chứng cho thấy sự hiện diện của các kháng thể đối với kháng nguyên axit mycolic trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi nhiễm lao hoạt tính.

Các phương pháp được mô tả trong WO 2005/116654 và WO 2013/186679 đề cập đến các phương pháp đáng tin cậy để chẩn đoán bệnh lao, tuy nhiên vẫn có nhiều nhược điểm. Thứ nhất, các phương pháp được mô tả trong WO 2005/116654 và WO 2013/186679 yêu cầu cung cấp một vài mẫu từ cùng một đối tượng. Thứ hai, những phương pháp này đòi hỏi một vài bước pha loãng và một vài bước chuyển mẫu tới các thiết bị riêng biệt khác nhau, vì vậy đòi hỏi phải có bộ trang thiết bị phức tạp và lớn. Thứ ba, các phương pháp này liên quan đến các bước ủ mẫu riêng biệt và pha loãng chúng; từ đó cần có các phép đo riêng biệt. Do đó các phương pháp theo sáng chế WO 2005/116654 và WO 2013/186679 rất phức tạp và mất nhiều thời gian. Trên

thực tế, tổng thời gian lấy mẫu theo phương pháp trong sáng chế WO 2005/116654 và WO 2013/186679 từ một đối tượng nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính để xác định xem đối tượng đó có nhiễm lao hoạt tính hay không ước tính ít nhất là khoảng 2 giờ cho mỗi mẫu. Hơn nữa, các phương pháp này đòi hỏi bộ trang thiết bị phức tạp và lớn, vì vậy phương pháp này có thể hữu ích trong môi trường bệnh viện nhưng sẽ không phù hợp ở các khu vực thiếu bệnh viện và không có dịch vụ chăm sóc sức khỏe phát triển tốt, ví dụ ở các quốc gia đang phát triển. Đặc biệt bệnh lao phổ biến nhất ở những quốc gia này, vì vậy việc chẩn đoán đáng tin cậy và nhanh chóng bệnh lao là mong muốn lớn nhất ở các quốc gia này.

Do đó, mục tiêu của sáng chế là đề xuất phương pháp để xác định xem một cá nhân có bị nhiễm lao hoạt tính hay không (ví dụ lao phổi hoặc lao ngoài phổi) một cách nhanh và đáng tin cậy và có thể thực hiện bên ngoài môi trường y tế chuyên nghiệp, tức là bên ngoài bệnh viện, ví dụ như trên đường phố.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp tiền xử lý mẫu thu từ những người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính như được xác định trong yêu cầu bảo hộ 11.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất thiết bị chẩn đoán xách tay như được xác định trong yêu cầu bảo hộ 20.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất hệ thống để thực hiện phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động như được xác định trong yêu cầu bảo hộ 29 và 35.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất hệ thống tiền xử lý mẫu từ những người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính như được xác định theo điểm yêu cầu bảo hộ 32.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất bộ kit như được xác định trong yêu cầu bảo hộ 39 và 40.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 mô tả phương án thực hiện ưu tiên thiết của thiết bị theo sáng chế.

Fig.2 mô tả phương án thực hiện ưu tiên của hệ thống theo điểm yêu cầu bảo hộ 32.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nguyên tắc của sáng chế dựa trên sự nhận định của tác giả sáng chế rằng kháng thể kháng dẫn xuất axit mycolic trong mẫu có thể được phát hiện nhanh và đáng tin cậy nếu mẫu được tiền xử lý theo các bước i) -v) của các phương pháp được mô tả dưới đây.

Phương pháp phát hiện thời gian thực

Phương pháp phát hiện các kháng thể kháng dẫn xuất axit mycolic, cụ thể là các kháng thể kháng yếu tố thường hoặc các kháng thể kháng axit mycolic (MA) trong mẫu, trong đó việc phát hiện xảy ra theo thời gian thực.

Phương pháp này bao gồm các bước sau:

- i) chuẩn bị mẫu từ người hoặc động vật bị nghi ngờ mắc bệnh lao đang hoạt động;
- ii) cho mẫu tiếp xúc với lipit sterol;
- iii) thu được ít nhất hai phần của mẫu nói trên hoặc trước khi hoặc sau khi phơi nhiễm mẫu đó với lipit sterol;
- iv) phơi nhiễm phần mẫu thứ nhất thu được với cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;
- v) phơi nhiễm phần mẫu thứ hai thu được với cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

vi) phơi nhiễm phần mẫu được phơi nhiễm trong bước iv) với cơ chất xét nghiệm mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định và phơi nhiễm phần mẫu được phơi nhiễm trong bước v) với cơ chất đối chứng mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

vii) phát hiện liên kết của kháng thể với kháng nguyên ở bước vi) trong thời gian thực; và

viii) so sánh mức độ liên kết kháng thể giữa cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng, liên kết kháng nguyên kháng thể với cơ chất xét nghiệm ít hơn so với đối chứng cho thấy sự hiện diện của các kháng thể đối với kháng nguyên axit mycolic trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi nhiễm lao hoạt tính. Phương pháp này sẽ được giới thiệu trong suốt sáng chế như là “phương pháp thời gian thực”.

Phương pháp thời gian thực cho phép các mẫu, tốt nhất là các mẫu máu được phân tích một cách đáng tin cậy và nhanh chóng mà không cần phải chuyển mẫu từ ống này sang ống khác. Sau bước ủ sơ bộ mẫu với lipit sterol, tiến hành đưa một phần mẫu đến ủ sơ bộ với kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic để lấy mẫu xét nghiệm và một phần khác của mẫu đến ủ sơ bộ tương tự nhưng không có kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic để lấy mẫu đối chứng, tạo mẫu phù hợp để thực hiện trực tiếp trong bước phát hiện để dẫn đến sự liên kết các kháng nguyên axit mycolic trong mẫu đã được tiền xử lý với cơ chất cảm biến sinh học mang axit mycolic. Vì vậy, cơ chất cảm biến sinh học không đòi hỏi phải ủ sơ bộ hoặc tiền xử lý cảm biến với mẫu pha loãng. Theo đó, phương pháp theo sáng chế không đòi hỏi các bước pha loãng và chuyển mẫu cần thiết như trong các phương pháp của kỹ thuật hiện nay.

Hơn nữa, phương pháp thời gian thực của sáng chế phù hợp để thực hiện bằng thiết bị xách tay, cụ thể là các thiết bị được mô tả dưới đây. Phương pháp này cho phép xác định xem một cá nhân có bị nhiễm lao hoạt tính hay không (ví dụ lao phổi hoặc lao ngoài phổi) một cách nhanh chóng và đáng tin cậy và cho phép phát hiện bệnh lao trong vòng 15 đến 25 phút. Hơn nữa, phương pháp này có thể được thực hiện bên ngoài môi trường y tế chuyên nghiệp.

Cụ thể là, phương pháp thời gian thực cung cấp phương pháp xét nghiệm nhanh tại chỗ để xác định xem một cá nhân có bị nhiễm lao hoạt tính hay không tức là xét nghiệm tại chỗ hoặc gần khu vực chăm sóc bệnh nhân. Các xét nghiệm của sáng chế cung cấp các xét nghiệm y tế đơn giản có thể được thực hiện tại giường bệnh.

Hơn nữa, phương pháp thời gian thực chỉ đòi hỏi phải lấy một mẫu từ đối tượng và mẫu đó có thể được sử dụng trực tiếp trong phương pháp của sáng chế.

Phương pháp thời gian thực của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng việc tham khảo các bước thực hiện phương pháp thời gian thực dưới đây.

Bước i (phương pháp thời gian thực)

Phương pháp thời gian thực của sáng chế dựa trên xét nghiệm chẩn đoán các mẫu, cụ thể là các mẫu máu của người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính. Mục đích trong bước i) của phương pháp thời gian thực của sáng chế là chuẩn bị được mẫu của người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính. Mẫu tốt nhất là mẫu máu toàn phần. Mẫu có thể thu được bằng bất kỳ phương tiện thông thường nào để lấy máu từ đối tượng. Mẫu được sử dụng trong phương pháp của sáng chế có thể đã được thu thập ở giai đoạn trước đó, được lưu trữ cho đến khi sử dụng trong điều kiện thích hợp và được cung cấp tại một thời điểm thích hợp. Ngoài ra, một mẫu có thể được xét nghiệm bằng phương pháp của sáng chế tại chỗ, tức là dưới dạng xét nghiệm nhanh tại chỗ. Trong trường hợp này, hệ thống xét nghiệm xách tay của sáng chế sẽ đặc biệt phù hợp để sử dụng.

Trong trường hợp mẫu là mẫu máu toàn phần, mẫu có thể tùy thuộc vào cách phát hiện liên kết kháng thể với kháng nguyên để được lọc hoặc tách huyết tương hoặc huyết thanh trước bước ii). Trong trường hợp việc phát hiện được thực hiện bằng các phương tiện phát hiện các chất khác nhau, một bước lọc có thể được ưu tiên thực hiện trước để lọc các thành phần khối lượng cao như tế bào máu. Trong trường hợp phát hiện liên kết bằng huỳnh quang có thể chọn cách không tiến hành lọc mẫu. Điều này thậm chí còn rút ngắn thời gian cần thiết để chẩn đoán.

Mẫu tốt nhất là mẫu có nguồn gốc từ máu. Mẫu có thể là mẫu máu toàn phần, mẫu huyết tương hoặc mẫu huyết thanh. Huyết thanh là huyết tương không có các yếu tố đông máu và được ưu tiên sử dụng trong xét nghiệm hơn so với huyết tương. Từ huyết tương trong sáng chế do đó có thể dùng để chỉ huyết thanh (máu). Việc lựa chọn sử dụng huyết tương hoặc huyết thanh phụ thuộc vào việc thiết bị của sáng chế có được thiết kế để tách máu toàn phần thành huyết tương hoặc huyết thanh hay không. Huyết thanh được ưu tiên sử dụng hơn bởi vì nó chứa ít tạp chất hơn so với huyết tương, những tạp chất này có thể dẫn đến các tương tác đặc biệt hoặc hoạt động sinh học không mong muốn. Ngoài ra huyết thanh có thể có độ nhớt thấp hơn huyết tương. Vì vậy việc sử dụng huyết thanh có thể tránh được công đoạn pha loãng mẫu, từ đó tiết kiệm được thời gian và vật liệu.

Trong mẫu máu toàn phần chứa khoảng 55% huyết tương / huyết thanh. Nếu mẫu máu toàn phần không được lọc hoàn toàn hoặc nếu tình trạng thể chất của bệnh nhân đòi hỏi việc không lọc hoàn toàn đó, có thể cần pha loãng mẫu máu toàn phần hoặc huyết tương hoặc huyết thanh. Vì vậy, các từ huyết tương hoặc huyết thanh trong sáng chế có thể chỉ huyết tương hoặc huyết thanh đã được pha loãng.

Do đó, việc pha loãng máu hoặc huyết tương có thể được thực hiện theo phương pháp thời gian thực của sáng chế với độ pha loãng 250-5000 lần, 750-1250 lần, cụ thể như độ pha loãng 4000, 2000 hoặc 1000 lần. Tùy thuộc vào độ nhớt của mẫu, bước pha loãng như vậy có thể tiến hành trước khi tách huyết tương khỏi máu hoặc sau bước tách huyết tương hoặc thay thế cho bước tách huyết tương. Cụ thể, bước pha loãng có thể thực hiện sau bước tách, nhưng trước bước iv) hoặc v) hoặc sau bước v)/vi) và trước bước vii). Tốt hơn là nên pha loãng mẫu sau bước v)/vi) và trước bước vii) tức là ngay trước khi mẫu được đưa vào bộ cảm biến sinh học. Theo cách này, thể tích của mẫu được giữ càng thấp càng tốt trong hầu hết các bước của phương pháp, điều này có lợi cho tốc độ xét nghiệm của quy trình và độ nhỏ gọn của thiết bị được sử dụng.

Pha loãng có thể được thực hiện với chất pha loãng phù hợp bất kỳ, ví dụ như dung dịch đệm phosphat (PBS). Dung dịch đệm có thể là đệm PBS/AE bao gồm NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 và EDTA trong nước ở pH sinh lý. Dung dịch đệm

có thể là đệm PBS gồm 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 và 1,05 g Na_2HPO_4 hòa tan trong một lít nước cất hai lần, nước khử ion có chứa 1 mM EDTA và 0,025% (m/V) natri azit và được điều chỉnh đến pH 7,4.

Mẫu máu toàn phần hoặc huyết tương hoặc huyết thanh có thể được pha loãng thêm với các thuốc chống đông máu, như EDTA, heparin hoặc xitrat.

Dung dịch rửa bất kỳ có thể được thêm vào trong máu/huyết tương/huyết thanh với nồng độ thấp để tránh các thành phần dính vào thành ống hoặc thành ống chứa.

Bước ii (phương pháp thời gian thực)

Trong bước ii, mẫu được phơi nhiễm, tức là tiếp xúc với lipit sterol.

Mặc dù các tác giả sáng chế không muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết nào nhưng cần thừa nhận rằng lipit sterol loại bỏ các kháng thể kháng cholesterol từ mẫu, nếu không các kháng thể này sẽ phản ứng chéo với các kháng nguyên axit mycolic trên cơ chất cảm biến và dẫn đến chẩn đoán dương tính giả bệnh lao.

Thời gian phơi nhiễm của mẫu với lipit sterol tốt nhất là dưới 10 phút, cụ thể là 2-8 phút, 3-7 phút, 4-6 phút hoặc khoảng 5 phút. Thời gian phơi nhiễm tùy thuộc vào cách mẫu được tiếp xúc với lipit sterol.

Một cách thức mẫu mực để phơi nhiễm mẫu với lipit sterol là dẫn mẫu vào một xoắn ốc dài được phủ trước bằng một lipit sterol, tốt nhất là cholesterol và đưa mẫu dọc theo chiều dài của ống. Ở cuối ống, mẫu đã được phơi nhiễm lipit sterol có thể chảy qua thiết bị dạng điểm phân nhánh bằng van thụ động để phân dòng mẫu đến cơ chất tiếp theo mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic ở bước v) và cơ chất không mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic ở bước vi), tức là một ống chứa có chứa cơ chất mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic, và một ống chứa chứa cơ chất không mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic.

Một phương pháp thay thế khác để phơi nhiễm mẫu với lipit sterol là tiêm mẫu vào một ống chứa cholesterol, sau đó ủ trong vòng dưới 10 phút.

Mẫu máu toàn phần hoặc huyết tương hoặc huyết thanh có chứa hàng trăm loại phân tử khác nhau có tính chất ưa nước và kỵ nước. Do đó vật liệu được sử dụng làm cơ chất phải tương thích với các liên kết không đặc hiệu của các phân tử trong mẫu. Trong trường hợp sáng chế, cơ chất được hiểu là một vật liệu hỗ trợ.

Bước iv và v (phương pháp thời gian thực)

Trong bước tiếp theo, một phần của mẫu đã phơi nhiễm với lipid sterol được phơi nhiễm với cơ chất mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic (bước iv) và một phần khác của mẫu đã được phơi nhiễm với lipid sterol được phơi nhiễm với cơ chất không mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic (bước v).

Để có được ít nhất hai phần mẫu đã được phơi nhiễm với lipid sterol, tại một thời điểm nhất định trong quá trình, dòng máu/huyết tương phải được tiến hành chia thành từng phần (bước iii của phương pháp thời gian thực). Để thuận tiện và tối ưu hóa độ tin cậy của phương pháp, tốt nhất nên chia dòng mẫu ra sau khi mẫu đã được phơi nhiễm với lipid sterol, tức là mẫu đã được phơi nhiễm với lipid sterol được chia thành ít nhất làm hai phần để chuẩn bị một dòng xét nghiệm và một dòng đối chứng. Tốt hơn là mẫu được chia thành hai phần bằng nhau hoặc tương đương nhau để cho phép so sánh đơn giản cả hai phần mẫu mà không cần tính toán hiệu chỉnh. Việc chia dòng mẫu có thể được thực hiện bằng phương tiện bất kỳ để chia dòng mẫu như điểm phân nhánh bằng van tự động.

Ngoài ra, dòng mẫu (mẫu được lọc thành huyết tương hoặc huyết thanh) được chia thành ít nhất hai phần mẫu sau bước lọc và trước khi có sự phơi nhiễm với lipid sterol. Dòng máu cũng được tiến hành chia ra trước khi lọc. Điều này ít được ưu tiên hơn vì trong trường hợp này yêu cầu cần có có hai bộ lọc.

Loại cơ chất dùng để mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic và loại cơ chất không mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic ở các bước iv) và v) tốt nhất là cùng loại vật liệu.

Ngoài ra, vì lipit sterol, (ví dụ cholesterol) và các dẫn xuất axit mycolic đều kỵ nước nên các cơ chất dùng để phơi nhiễm trong các bước iv) và v) sẽ được làm bằng vật liệu giống như cơ chất được sử dụng trong bước ii). Điều này được hiểu rằng vật liệu dùng làm cơ chất thích hợp là vật liệu trơ với các liên kết không đặc hiệu của các phân tử trong mẫu.

Thời gian phơi nhiễm của mẫu với lipit sterol tốt nhất là dưới 10 phút, cụ thể như 2-8 phút, 3-7 phút, 4-6 phút hoặc khoảng 5 phút.

Một cách để phơi nhiễm mẫu với các cơ chất của bước iv) và v) là dẫn dòng mẫu được chia vào các ống xoắn ốc dài, tốt nhất là được lắp đặt trên một vi mạch, được phủ sẵn cơ chất mang dẫn xuất axit mycolic (bước iv) hoặc cơ chất không mang dẫn xuất axit mycolic (bước v) và đưa dòng mẫu dọc theo chiều dài của các ống này. Khoảng cách từ cả hai ống đến cảm biến sinh học sẽ phải có cùng độ lớn. Điều quan trọng là phải có càng ít càng tốt các liên kết không đặc hiệu với vật liệu làm cơ chất.

Một phương pháp thay thế khác để phơi nhiễm các phần mẫu đã phơi nhiễm với lipit sterol với cơ chất được phủ dẫn xuất axit mycolic và cơ chất không được phủ dẫn xuất axit mycolic là tiêm dòng mẫu thứ nhất vào trong một ống chứa có chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định (bước iv), và tiêm dòng mẫu thứ hai vào trong một ống chứa có chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định (bước v) và ủ các mẫu trong vòng dưới 10 phút, cụ thể như 2-8 phút, 3-7 phút, 4-6 phút hoặc khoảng 5 phút.

Bước vi (phương pháp thời gian thực)

Trong bước này, các dòng phần mẫu đã phơi nhiễm lipit sterol, hoặc đã phơi nhiễm với dẫn xuất axit mycolic trong bước iv) (dòng xét nghiệm) hoặc không ở bước v) (dòng đối chứng) được dẫn đến các cơ chất tiếp theo, cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng tương ứng, mang dẫn xuất axit mycolic, tốt nhất là giống như dẫn xuất ở bước iv).

Các cơ chất xét nghiệm và đối chứng này được chứa trong một cảm biến sinh học bao gồm khoang thứ nhất (khoang xét nghiệm) có chứa cơ chất xét nghiệm để

tiếp nhận dòng xét nghiệm phơi nhiễm với các dẫn xuất axit mycolic trong bước iv) và trong khoang thứ hai (khoang đối chứng) có chứa cơ chất đối chứng để tiếp nhận dòng đối chứng không phơi nhiễm với các dẫn xuất axit mycolic trong bước v). Các cơ chất trong cả hai khoang tốt nhất là được làm từ cùng một vật liệu và mang cùng loại dẫn xuất axit mycolic. Cảm biến sinh học trong trường hợp này có thể là phương tiện bất kỳ có khả năng tạo ra một tín hiệu đo được khi các kháng thể tiếp xúc với các dẫn xuất axit mycolic trên cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng.

Tốt nhất là các vật liệu dùng làm cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng của bước vi) là cơ chất làm từ silic, chẳng hạn như cơ chất làm silic dioxit. Cơ chất làm từ silic đặc biệt hữu ích khi sử dụng công nghệ cộng hưởng vòng để phát hiện liên kết của kháng thể với các kháng nguyên axit mycolic cố định. Tốt nhất là việc phát hiện được thực hiện bằng cách sử dụng chip cảm biến sinh học có sử dụng bộ cộng hưởng vòng làm bằng silic. Điều này cho phép phương pháp của sáng chế được thực hiện với thiết bị rất nhỏ gọn.

Cơ chất của bước vi) cũng có thể được làm từ kim loại vàng. Cơ chất làm từ vàng đặc biệt hữu ích khi quang phổ cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc quang phổ tổng trở điện hóa được sử dụng để phát hiện liên kết của kháng thể với các kháng nguyên axit mycolic cố định.

Bước vii và viii (phương pháp thời gian thực)

Trong bước vii, sự liên kết của các kháng thể với các kháng nguyên axit mycolic cố định được phát hiện. Bởi vì phát hiện xảy ra trong thời gian thực, nên sự liên kết của các kháng thể với các kháng nguyên axit mycolic cố định được phát hiện trực tiếp trong suốt quá trình xuất hiện liên kết. Vì vậy, phải hiểu rằng các bước vi và vii không phải là các bước cần thực hiện ở những thời điểm riêng biệt. Điều này cũng áp dụng cho bước viii, tức là việc so sánh và phát hiện có thể thực hiện trong khi quá trình tạo liên kết của bước vii vẫn đang diễn ra. Kỹ thuật phân tích tương tác không đánh dấu được sử dụng để thực hiện việc phát hiện nói chung trong thời gian thực, ví dụ như quang phổ cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc đo nhiệt độ chuẩn đẳng quang

phổ tổng trở điện hóa, giao thoa lớp sinh học, lưới quang, tinh thể quang tử, ghi lại cộng hưởng âm, vi cân tinh thể thạch anh.

Việc phát hiện liên kết của các kháng thể và cả các vật liệu khác với kháng nguyên axit mycolic có thể được thực hiện trong một thiết bị tự động. Có nhiều thiết bị tự động được người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật biết đến và người có trình độ trung bình có thể lựa chọn các công cụ phần mềm phù hợp để thực hiện việc so sánh ở bước viii) về mức độ liên kết kháng thể kháng nguyên giữa cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng. Bất cứ sự nhận thấy nào mà chỉ ra liên kết trong cơ chất xét nghiệm ít hơn so với đối chứng cho thấy sự hiện diện của các kháng thể đối với kháng nguyên trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi nhiễm lao hoạt tính. Trong trường hợp này, cần hiểu rằng sự ít hơn có thể được hiểu là về chất lượng và số lượng, tức là liên kết ít hơn có thể được hiểu là có số lượng liên kết ít hơn và có sự liên kết yếu hơn.

Thiết bị để thực hiện phương pháp thời gian thực

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thiết bị xách tay thực hiện phương pháp thời gian thực để phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động, bao gồm ít nhất một ống chứa lipid sterol được bố trí và được cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính; phương tiện để chia dòng mẫu nói trên thành ít nhất hai dòng mẫu, dòng mẫu thứ nhất và dòng mẫu thứ hai; phương tiện kể trên có kết nối ở đầu trên hoặc đầu dưới của ống chứa lipid sterol; một ống chứa khác (ống chứa thứ hai) sử dụng cho việc tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và nối với đầu dưới của ống chứa lipid sterol và chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và thêm một ống chứa khác (ống chứa thứ ba) sử dụng cho việc tiếp nhận dòng mẫu thứ hai, được bố trí song song với ống chứa kể trên và nối với đầu dưới của ống chứa lipid sterol và chứa cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định và cảm biến sinh học bao gồm khoang thứ nhất để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và kết nối với ống chứa thứ hai và chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và khoang thứ hai để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai và kết nối với ống chứa thứ ba và

chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định giống như khoang thứ nhất.

Tốt nhất là thiết bị của sáng chế bao gồm ống được bố trí và cấu hình có đầu xuyên qua da và tiếp nhận mẫu máu từ đầu xâm nhập vào da và chuyển mẫu máu kể trên từ vị của da đến ống chứa chứa lipit sterol.

Theo một phương án thực hiện khác, thiết bị bao gồm bộ phận lọc được nối với ống thứ nhất nói trên để nhận mẫu máu nói trên và được cấu hình để tách huyết tương ra khỏi mẫu máu toàn phần nói trên.

Theo phương án thực hiện ưu tiên khác của sáng chế, thiết bị xách tay có một đầu xuyên qua da nối với ống thứ nhất, ống này được bố trí và cấu hình để nhận mẫu máu từ đầu xuyên qua da và mang mẫu máu đó ra khỏi vùng da; một bộ lọc nối với ống thứ nhất kể trên để nhận mẫu máu nói trên và được cấu hình để tách huyết tương ra khỏi mẫu máu toàn phần nói trên; ống chứa thứ nhất dùng để tiếp nhận mẫu kể trên và chứa lipit sterol; phương tiện chia mẫu nói trên chia mẫu thành ít nhất hai dòng mẫu: dòng mẫu thứ nhất và dòng mẫu thứ hai; ống chứa thứ hai dùng để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; ống chứa thứ ba dùng để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai và chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và bộ cảm biến sinh học bao gồm khoang thứ nhất để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và kết nối với ống chứa thứ hai và chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và khoang thứ hai để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai và kết nối với ống chứa thứ ba và chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định giống như khoang thứ nhất.

Tốt nhất là, dòng mẫu được bơm qua bằng máy bơm, và tốt nhất là bơm dòng chảy liên tục, ví dụ như bơm nhu động hoặc bơm màng. Bơm được bố trí ở phía dưới của cảm biến sinh học để có thể hút mẫu qua thiết bị và để tránh nhiễm mẫu trước khi phân tích.

Các phương tiện xuyên qua da có thể là phương tiện thích hợp bất kỳ để lấy mẫu máu từ người hoặc động vật, chẳng hạn như bơm kim tiêm hoặc các loại tương tự.

Ông thứ nhất có kích thước phù hợp với mục đích của thiết bị, tức là nó cần phải phù hợp với các phương tiện xuyên qua da và ống chứa thứ nhất.

Các bộ phận của thiết bị, tức là các ống chứa, phương tiện để pha loãng, bộ lọc và bộ cảm biến sinh học có thể được kết nối với nhau bằng các ống nối thích hợp. Ngoài ra, các bộ phận của thiết bị có thể được thiết kế sao cho chúng có thể được kết nối trực tiếp với nhau. Vật liệu làm ống được sử dụng theo sáng chế có thể là vật liệu phù hợp bất kỳ được biết đến bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực xét nghiệm mẫu máu. Vật liệu phù hợp có tính trơ với các thành phần của máu hoặc huyết tương hoặc huyết thanh bao gồm polytetrafluetylen (ví dụ Teflon®), polypropylen, polyeteketon (PEEK) và polyetylen.

Các bộ phận khác có thể kết nối với các bộ phận của thiết bị. Những bộ phận này có thể được nối bằng các ống kết nối hoặc gắn trực tiếp với nhau.

Thiết bị của sáng chế cũng có thể bao gồm phương tiện để pha loãng máu hoặc huyết tương. Các phương tiện này có thể được lắp đặt ở trước ống chứa có chứa lipit sterol, trước bộ lọc, giữa bộ phận lọc và ống chứa có chứa lipit sterol, giữa ống chứa lipit sterol và ống chứa khác (ống chứa thứ hai và thứ ba) hoặc giữa ống chứa thứ hai / ống chứa thứ ba và các khoang tương ứng của bộ cảm biến sinh học. Tốt nhất là các phương tiện pha loãng mẫu được đặt nối giữa ống chứa thứ hai và bộ cảm biến sinh học và giữa ống chứa thứ ba và bộ cảm biến sinh học. Ví dụ một ống chứa thể tích 10 ml có thể được đặt ở đầu ra của ống chứa thứ hai và ống chứa thứ ba. Một đệm thích hợp có thể có sẵn trong ống chứa hoặc được thêm vào ống chứa để tạo ra độ pha loãng mong muốn. Theo cách này, thể tích của mẫu được giữ càng thấp càng tốt trong hầu hết các bước của sáng chế, điều này có lợi cho tốc độ xét nghiệm của quy trình và độ nhỏ gọn của thiết bị được sử dụng.

Các ống chứa có thể là lọ, ống dẫn dạng máng hoặc ống dẫn tròn, cụ thể như ống máng xoắn ốc hoặc ống xoắn ốc. Một ống máng xoắn hoặc ống xoắn là tốt nhất vì cấu trúc như vậy cần ít không gian trong khi vẫn duy trì một con đường dòng chảy dài. Một ống máng xoắn hoặc ống xoắn có thể được lắp đặt dễ dàng trên một vi mạch. Điều này đóng góp vào độ nhỏ gọn của thiết bị theo sáng chế.

Bộ lọc có thể bao gồm lưới lọc. Tốt nhất là bộ lọc được lắp đặt trên một vi mạch bộ lọc để có được bộ lọc nhỏ gọn.

Vật liệu dùng làm các ống chứa tốt nhất là cùng một loại vật liệu phù hợp, có thể là thủy tinh bk-7, polytetrafloetylen, polypropylen, polyete keton hoặc polyetylen.

Cơ chất được đựng bên trong ống chứa phải là vật liệu trơ để không liên kết đặc hiệu với các phân tử của mẫu, ví dụ thủy tinh bk-7, polytetrafloetylen, polypropylen, polyete keton hoặc polyetylen.

Thiết bị bao gồm một ống chứa chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định (ống chứa thứ hai) và một ống chứa chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định. Để thay thế cho kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, các ống chứa phía sau có thể phủ hoặc không phủ chất trơ, miễn là không có liên kết đặc hiệu nào xảy ra.

Tốt nhất là các vật liệu dùng làm cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng chứa trong khoang cảm biến sinh học là cơ chất làm từ silic, chẳng hạn như cơ chất làm từ silic dioxit. Cơ chất làm từ silic đặc biệt hữu ích khi sử dụng công nghệ cộng hưởng vòng để phát hiện liên kết của kháng thể với các kháng nguyên axit mycolic cố định.

Bộ cảm biến sinh học bao gồm một khoang thứ nhất và khoang thứ hai. Cần hiểu rằng hai khoang không cần phải gắn cùng với nhau. Cụ thể là, bộ cảm biến sinh học có thể bao gồm hai bộ phận cảm biến riêng biệt, mỗi bộ cảm biến có khoang chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định. Một bộ cảm biến được nối với ống chứa có chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định thông qua ống nối, một bộ cảm biến khác được nối với ống chứa có chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định thông qua ống nối.

Tốt nhất là, bộ cảm biến sinh học bao gồm một bộ cộng hưởng vòng làm bằng silic. Điều này cho phép thiết bị của sáng chế có kích thước nhỏ gọn.

Theo khía cạnh này, sáng chế cũng đề cập đến bộ cảm biến sinh học bao gồm ít nhất hai khoang chứa cơ chất làm từ silic mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định và một bộ cộng hưởng vòng làm bằng siic.

Cơ chất trong các khoang của cảm biến sinh học cũng có thể được làm từ kim loại vàng. Cơ chất làm từ vàng đặc biệt hữu ích khi quang phổ cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc quang phổ tổng trở điện hóa được sử dụng để phát hiện liên kết của kháng thể với các kháng nguyên axit mycolic cố định.

Thiết bị của sáng chế có thể được kết nối với phương tiện phân tích tự động thích hợp bất kỳ, cụ thể như máy tính có các chương trình phần mềm thích hợp để thực hiện việc so sánh độ liên kết giữa các kháng thể axit mycolic với các kháng nguyên được cố định trong khoang của bộ cảm biến sinh học.

Phương án thực hiện mẫu thiết bị của sáng chế được minh họa trong Fig.1.

Fig.1 minh họa mũi xuyên qua da 1 được nối với ống dẫn thứ nhất 2, ống này được bố trí và cấu hình để nhận máu từ kim 1 và đưa lượng máu đi ra khỏi vùng da. Ống dẫn 2 được nối với bộ phận lọc 3. Bộ phận lọc có vai trò tách huyết tương ra khỏi mẫu máu toàn phần. Bộ phận lọc 3 được nối qua ống dẫn 13 đến ống chứa thứ nhất 4 có dạng ống xoắn ốc, trong đó mặt trong ống chứa 4 được phủ lipit sterol. Ống xoắn ốc 4 được nối qua ống dẫn 14 đến phương tiện có dạng van thụ động phân nhánh 5 để chia huyết tương. Một nhánh của điểm phân nhánh được nối qua ống dẫn 16 đến ống chứa thứ hai 6 chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận dòng mẫu huyết tương thứ nhất. Nhánh còn lại của điểm phân nhánh được nối qua ống dẫn 15 đến ống chứa thứ ba 7 chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận dòng mẫu huyết tương thứ hai. Các ống chứa 6 và 7 theo phương án thực hiện có dạng ống xoắn ốc và bên trong thành ống được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic (ống chứa 6) hoặc không được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic (ống chứa 7). Các ống chứa 6 và 7 được kết nối thông qua các ống dẫn tương ứng 17 và 18 đến các ống chứa pha loãng 11 và 12 tương ứng. Các ống chứa pha loãng có thể chứa sẵn đệm pha loãng thích hợp, các ống pha loãng 11 và 12 bao gồm các miệng nạp 21, 22 tương

ứng để bổ sung đệm pha loãng. Các ống chứa pha loãng 11 và 12 được nối qua các ống dẫn 19 và 20 tương ứng đến khoang xét nghiệm 9 của bộ cảm biến sinh học 8 và đến khoang đối chứng 10 của cảm biến sinh học 8 tương ứng. Các khoang xét nghiệm và đối chứng 9 và 10 đều chứa cùng một loại cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định.

Bộ dụng cụ (kit)

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến bộ kit được sử dụng để chẩn đoán bệnh lao sử dụng phương pháp phát hiện thời gian thực, bao gồm một hoặc nhiều phương tiện xuyên qua da; một hoặc nhiều ống nối; một hoặc nhiều ống chứa được phủ lipid sterol và chất bất kỳ bao gồm photphatidyl cholin, pectin, amphotericin B hoặc β -cyclodextrin; một hoặc nhiều ống chứa chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; một hoặc nhiều ống chứa chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và một hoặc nhiều bộ cảm biến sinh học có ít nhất hai khoang chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và phương tiện bất kỳ để pha loãng máu hoặc huyết tương và/hoặc bộ lọc.

Bộ kit cũng có thể bao gồm các công cụ để lắp ráp các thành phần, chẳng hạn như vít, kẹp, keo, băng, tua vít v.v

Bộ kit cũng có thể chứa các phương tiện để pha loãng máu hoặc huyết tương trong suốt quá trình phân tích máu. Cụ thể là ống chứa (ví dụ có thể tích 10ml) được đặt tại đầu ra của ống chứa thứ hai và thứ ba. Một đệm thích hợp có thể có sẵn trong ống chứa hoặc được thêm vào ống chứa để tạo ra độ pha loãng mong muốn.

Các thành phần của bộ kit cho phép người thực hiện xét nghiệm chẩn đoán bệnh lao lắp ráp thiết bị của sáng chế tại chỗ, tức là tại điểm mong muốn. Do đó cần hiểu rằng các thành phần của bộ kit có cùng đặc tính và các tính chất ưu việt như đã giải thích ở trên đối với thiết bị của sáng chế. Thiết bị của sáng chế dễ dàng được lắp ráp từ các thành phần của bộ kit theo sáng chế, tức là không yêu cầu kỹ thuật chuyên môn. Bộ kit có thể được cung cấp một cách tiện lợi với các hướng dẫn lắp ráp và sử dụng.

Phương pháp điểm cuối

Sáng chế đề cập đến một khía cạnh khác của phương pháp phát hiện các kháng thể kháng dẫn xuất axit mycolic, cụ thể là các kháng thể kháng yếu tố thường hoặc các kháng thể axit mycolic (MA) trong mẫu bằng việc sử dụng xét nghiệm điểm cuối.

Phương pháp này bao gồm các bước sau:

i) chuẩn bị mẫu từ người hoặc động vật bị nghi ngờ mắc bệnh lao đang hoạt động;

ii) cho mẫu tiếp xúc với lipid sterol;

iii) thu ít nhất hai phần của mẫu hoặc trước khi hoặc sau khi phơi nhiễm mẫu đó với lipid sterol;

iv) phơi nhiễm phần mẫu thứ nhất thu được với cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

v) phơi nhiễm phần mẫu thứ hai thu được với cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

vi) phơi nhiễm ít nhất một phần mẫu đã được phơi nhiễm trong bước iv) với cơ chất xét nghiệm mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định và phơi nhiễm ít nhất một phần mẫu đã được phơi nhiễm trong bước v) với cơ chất đối chứng mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

vii) phát hiện liên kết của kháng thể với kháng nguyên ở bước vi) trong xét nghiệm điểm cuối; và

viii) so sánh mức độ liên kết kháng thể kháng nguyên giữa xét nghiệm và đối chứng. Liên kết kháng nguyên kháng thể trong xét nghiệm ít hơn so với đối chứng cho thấy sự hiện diện của các kháng thể đối với kháng nguyên axit mycolic trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi nhiễm lao hoạt tính. Phương pháp này sẽ được giới thiệu trong suốt sáng chế như là “phương pháp điểm cuối”.

Các bước phát hiện vi-viii) không nhất thiết phải tiến hành trực tiếp ngay sau các bước tiền xử lý i) -v). Cụ thể là các phần mẫu thu được sau bước v) có thể được lưu trữ cho đến khi được sử dụng tiếp hoặc để chuyển tới cơ chất xét nghiệm. Bằng cách này người sử dụng có sự linh hoạt cao trong việc lập kế hoạch xét nghiệm của mình. Cụ thể, thực tế các bước phát hiện vi-viii) không nhất thiết phải tiến hành trực tiếp ngay sau các bước tiền xử lý i) -v) cho phép việc xử lý các mẫu trước tiến hành, để chúng có thể được xét nghiệm tất cả cùng một lúc với vật liệu cơ chất, từ đó cải thiện độ tin cậy và sự tái sản xuất. Điều này cũng giúp cho việc xét nghiệm mẫu từ nhiều bệnh nhân được tiến hành trong cùng điều kiện.

Vì vậy, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tiền xử lý mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính cho việc phát hiện bệnh:

i) chuẩn bị mẫu từ người hoặc động vật bị nghi ngờ mắc bệnh lao đang hoạt động;

ii) cho mẫu phơi nhiễm với lipit sterol;

iii) thu được ít nhất hai phần của mẫu nói trên hoặc trước khi hoặc sau khi phơi nhiễm mẫu đó với lipit sterol;

iv) phơi nhiễm phần mẫu thứ nhất thu được với cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

v) phơi nhiễm phần mẫu thứ hai thu được với cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

trong đó, sau khi phơi nhiễm ở các bước iv) và v), ít nhất một phần của các phần mẫu được lưu trữ để sử dụng tiếp. Phương pháp này sẽ được giới thiệu trong suốt sáng chế dưới dạng “phương pháp tiền xử lý”.

Ngoài ra phương pháp điểm cuối của sáng chế cho phép các mẫu, tốt nhất là các mẫu máu được phân tích một cách đáng tin cậy và nhanh chóng. Sau bước i)-v) ủ sơ bộ mẫu với lipit sterol, tiến hành đưa một phần mẫu đến ủ sơ bộ với kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic để lấy mẫu xét nghiệm và một phần khác của mẫu

đến ủ sơ bộ tương tự nhưng không có kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic để lấy mẫu đối chứng, tạo mẫu phù hợp để thực hiện trực tiếp trong bước phát hiện để dẫn đến sự liên kết các kháng nguyên axit mycolic trong mẫu đã được xử lý trước với cơ chất cảm biến sinh học mang axit mycolic. Vì vậy, cơ chất không đòi hỏi phải ủ sơ bộ hoặc tiền xử lý với mẫu pha loãng. Theo đó, một số sự pha loãng và các bước chuyển mẫu như trong các phương pháp khác ở cùng lĩnh vực là không bắt buộc với phương pháp của sáng chế.

Hơn nữa phương pháp điểm cuối cho phép xác định xem một cá nhân có bị nhiễm lao hoạt tính (ví dụ lao phổi hoặc lao ngoài phổi) một cách nhanh chóng và đáng tin cậy và cho phép phát hiện bệnh lao trong vòng 15 đến 25 phút. Điều này đặc biệt là do các bước tiền xử lý i) -v) của phương pháp điểm cuối và phương pháp tiền xử lý. Hơn nữa, phương pháp điểm cuối có thể được thực hiện bên ngoài môi trường y tế chuyên nghiệp. Đặc biệt, phương pháp này cung cấp phương pháp xét nghiệm nhanh tại chỗ để xác định xem một cá nhân có bị nhiễm lao hoạt tính không tức là xét nghiệm tại hoặc gần khu vực chăm sóc bệnh nhân. Các xét nghiệm của sáng chế cung cấp các xét nghiệm y tế đơn giản có thể được thực hiện ở tại giường bệnh.

Hơn nữa, do các bước chuẩn bị trước i) - v) để lấy mẫu từ một đối tượng là đã đủ nên mẫu đó có thể được sử dụng trực tiếp để phát hiện bệnh mà không cần xử lý thêm.

Nguyên lý của phương pháp này của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng việc tham khảo các bước thực hiện phương pháp điểm cuối và phương pháp xử lý mẫu sơ bộ dưới đây.

Bước i (phương pháp điểm cuối / phương pháp tiền xử lý)

Phương pháp phát hiện điểm cuối của sáng chế dựa trên xét nghiệm chẩn đoán các mẫu, cụ thể là các mẫu máu của người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính. Mục đích trong bước i) là chuẩn bị được mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính. Mẫu tốt nhất là mẫu máu toàn phần. Mẫu có thể thu được bằng phương tiện thông thường bất kỳ để lấy máu từ đối tượng. Mẫu được sử dụng trong phương pháp của sáng chế có thể đã được thu thập ở giai đoạn trước đó, được lưu trữ trong điều kiện thích hợp cho đến khi sử dụng và được cung cấp tại một thời điểm

thích hợp. Ngoài ra, một mẫu có thể được sử dụng trong phương pháp phát hiện của sáng chế tại chỗ, tức là xét nghiệm nhanh tại chỗ. Một phương án khác là mẫu được xử lý ngay tại chỗ theo các bước i) -v) nêu trên, và các mẫu được tiền xử lý được lưu giữ cho đến khi sử dụng tiếp hoặc chuyển đến nơi khác để thực hiện việc phát hiện bệnh.

Trong trường hợp mẫu là mẫu máu toàn phần, mẫu có thể tùy thuộc vào cách phát hiện liên kết kháng thể với kháng nguyên để được lọc hoặc tách huyết tương hoặc huyết thanh trước bước ii). Trong trường hợp việc phát hiện được thực hiện bằng các phương tiện phát hiện các chất khác nhau, tốt nhất là thực hiện bước lọc để lọc các thành phần khối lượng cao như tế bào máu. Trong trường hợp phát hiện liên kết bằng huỳnh quang có thể không tiến hành lọc mẫu. Điều này thậm chí còn rút ngắn thời gian cần thiết để chẩn đoán và phòng trị.

Mẫu tốt nhất là mẫu có nguồn gốc từ máu. Mẫu có thể là mẫu máu toàn phần, mẫu huyết tương hoặc mẫu huyết thanh. Huyết thanh là huyết tương không có các yếu tố đông máu và được ưu tiên sử dụng trong xét nghiệm hơn so với huyết tương. Từ “huyết tương” theo sáng chế do đó có thể dùng để chỉ huyết thanh (máu). Việc lựa chọn sử dụng huyết tương hoặc huyết thanh phụ thuộc vào việc thiết bị của sáng chế có được thiết kế để tách máu toàn phần thành huyết tương hoặc huyết thanh hay không. Huyết thanh được ưu tiên sử dụng hơn bởi vì nó chứa ít tạp chất hơn so với huyết tương, những tạp chất này có thể dẫn đến các tương tác đặc biệt hoặc hoạt động sinh học không mong muốn. Ngoài ra huyết thanh có thể có độ nhớt thấp hơn huyết tương. Vì vậy việc sử dụng huyết thanh có thể tránh được công đoạn pha loãng mẫu, từ đó tiết kiệm được thời gian và vật liệu.

Trong mẫu máu toàn phần chứa khoảng 55% huyết tương/huyết thanh. Nếu mẫu máu toàn phần không được lọc hoàn toàn hoặc nếu tình trạng thể chất của bệnh nhân đòi hỏi việc không lọc hoàn toàn, có thể cần pha loãng mẫu máu toàn phần hoặc huyết tương hoặc huyết thanh. Vì vậy, các từ plasma hoặc huyết thanh trong sáng chế có thể chỉ huyết tương hoặc huyết thanh đã được pha loãng.

Việc pha loãng máu hoặc huyết tương có thể được thực hiện theo các phương pháp của sáng chế. Nên pha loãng mẫu 10-250 lần, cụ thể là khi xét nghiệm điểm cuối được thực hiện là kỹ thuật lọc miễn dịch vàng, cụ thể như kỹ thuật lọc đánh dấu miễn dịch vàng. Tùy thuộc vào độ nhớt của mẫu, bước pha loãng như vậy có thể tiến hành trước khi tách huyết tương khỏi máu hoặc sau bước tách huyết tương hoặc thay thế cho bước tách huyết tương. Cụ thể, bước pha loãng có thể thực hiện sau bước tách, nhưng trước bước iv) hoặc v) hoặc sau bước v)/vi) và trước bước vii).

Pha loãng có thể được thực hiện với chất pha loãng phù hợp bất kỳ, ví dụ như dung dịch đệm phosphat (PBS). Dung dịch đệm có thể là đệm PBS/AE bao gồm NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 và EDTA trong nước ở pH sinh lý. Dung dịch đệm có thể là đệm PBS gồm 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 và 1,05 g Na_2HPO_4 hòa tan trong một lít nước cất hai lần, nước khử ion có chứa 1 mM EDTA và 0,025% (m/V) natri azit và được điều chỉnh đến pH 7,4.

Mẫu máu toàn phần hoặc huyết tương hoặc huyết thanh có thể được pha loãng thêm với các chất chống đông máu, như EDTA, heparin hoặc xitrat.

Dung dịch rửa bất kỳ có thể được thêm vào trong máu/huyết tương/huyết thanh với nồng độ thấp để tránh các thành phần dính vào các thành ống hoặc thành ống chứa.

Bước ii (phương pháp điểm cuối / phương pháp tiên xử lý)

Trong bước ii, mẫu được phơi nhiễm, tức là tiếp xúc với lipit sterol.

Mặc dù tác giả sáng chế không muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết nào nhưng cần thừa nhận rằng lipit sterol loại bỏ các kháng thể kháng cholesterol từ mẫu, nếu không các kháng thể này sẽ phản ứng chéo với các kháng nguyên axit mycolic trên cơ chất cảm biến và dẫn đến chẩn đoán dương tính giả bệnh lao.

Thời gian phơi nhiễm của mẫu với lipit sterol tốt hơn là dưới 10 phút, cụ thể như 2-8 phút, 3-7 phút, 4-6 phút hoặc khoảng 5 phút. Thời gian phơi nhiễm tùy thuộc vào cách mẫu được tiếp xúc với lipit sterol.

Một cách thức mẫu mực để phơi nhiễm mẫu với lipit sterol là dẫn mẫu vào một ống xoắn ốc dài được phủ trước bằng một lipit sterol, tốt nhất là cholesterol và đưa mẫu dọc theo chiều dài của ống. Ở cuối ống, mẫu đã được phơi nhiễm lipit sterol có thể chảy qua thiết bị dạng điểm phân nhánh bằng van thụ động để phân dòng mẫu đến cơ chất tiếp theo mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic ở bước v) và cơ chất không mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic ở bước vi), tức là một ống chứa có chứa cơ chất mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic, và một ống chứa chứa cơ chất không mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic.

Một phương pháp thay thế khác để phơi nhiễm mẫu với lipit sterol là tiêm mẫu vào một ống chứa cholesterol, sau đó ủ trong vòng dưới 10 phút.

Một phương pháp thay thế khác để phơi nhiễm mẫu với lipit sterol là chứa lipit sterol trong các khoang của cột. Trong khoang đó, tốt nhất là lipit sterol được phủ trên thành khoang.

Mẫu máu toàn phần/huyết tương/huyết thanh có chứa hàng trăm loại phân tử khác nhau có tính chất ưa nước và kỵ nước. Do đó vật liệu được sử dụng làm cơ chất phải trợ với các liên kết không đặc hiệu của các phân tử trong mẫu. Trong trường hợp sáng chế, cơ chất được hiểu là vật liệu hỗ trợ.

Bước iv và v (phương pháp điểm cuối / phương pháp tiền xử lý)

Trong bước tiếp theo, một phần mẫu đã phơi nhiễm với lipit sterol được phơi nhiễm với cơ chất mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic (bước iv) và một phần khác của mẫu đã được phơi nhiễm với lipit sterol được phơi nhiễm với cơ chất không mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic (bước v).

Để có được ít nhất hai phần mẫu, tại một thời điểm nhất định trong quá trình dòng máu/huyết tương phải được phân chia (bước iii). Để thuận tiện và tối ưu hóa độ tin cậy của phương pháp, dòng mẫu nên được phân chia sau khi mẫu đã được phơi nhiễm với lipit sterol, tức là mẫu đã được phơi nhiễm với lipit sterol được chia thành ít nhất là hai phần để chuẩn bị một dòng xét nghiệm và một dòng đối chứng. Tốt nhất

là mẫu được chia thành hai phần bằng nhau hoặc tương đương nhau để cho phép so sánh đơn giản cả hai phần mẫu mà không cần tính toán hiệu chỉnh. Việc chia dòng mẫu có thể được thực hiện bằng phương tiện bất kỳ để chia dòng mẫu, cụ thể như điểm phân nhánh bằng van thụ động.

Ngoài ra, dòng mẫu (mẫu được lọc thành huyết tương hoặc huyết thanh) được chia thành ít nhất hai phần mẫu sau bước lọc và trước khi phơi nhiễm với lipit sterol. Ngoài ra, dòng máu cũng được phân chia trước khi lọc, tuy nhiên, điều này ít được ưu tiên hơn vì trong trường hợp này yêu cầu cần có có hai bộ lọc.

Trong trường hợp các cột được sử dụng, dòng mẫu trong trường hợp này được chia ra trước khi tiếp xúc với lipit sterol trong bước ii), để các bước ii) và iv) có thể diễn ra trong cùng một cột và bước ii) và v) có thể diễn ra trong cột khác.

Loại cơ chất mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic và loại cơ chất không mang kháng nguyên được cố định có nguồn gốc axit mycolic ở các bước iv) và v) tốt nhất là cùng loại vật liệu.

Ngoài ra, vì lipit sterol, (cụ thể là cholesterol) và các dẫn xuất axit mycolic đều kỵ nước nên các cơ chất dùng để phơi nhiễm trong các bước iv) và v) sẽ được làm bằng vật liệu giống như cơ chất được sử dụng trong bước ii). Điều này được hiểu rằng vật liệu dùng làm cơ chất thích hợp là vật liệu trơ với các phân tử liên kết không đặc hiệu của mẫu.

Thời gian phơi nhiễm của mẫu với lipit sterol tốt hơn là dưới 10 phút, cụ thể như 2-8 phút, 3-7 phút, 4-6 phút hoặc khoảng 5 phút.

Một cách thức mẫu mực để phơi nhiễm mẫu với cơ chất của bước iv) và v) là dẫn mẫu vào một ống xoắn ốc dài, tốt nhất là được lắp đặt trên một vi mạch, được phủ sẵn hoặc cơ chất mang dẫn xuất axit mycolic (bước iv) hoặc cơ chất không mang dẫn xuất axit mycolic (bước v) và đưa dòng mẫu dọc theo chiều dài của các ống này.

Một phương pháp thay thế khác để phơi nhiễm các phần mẫu đã phơi nhiễm với lipit sterol với cơ chất được phủ dẫn xuất axit mycolic và cơ chất không được phủ dẫn xuất axit mycolic là tiêm dòng mẫu thứ nhất vào trong một ống chứa có chứa cơ

chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định (bước iv), và tiêm dòng mẫu thứ hai vào trong một ống chứa có chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định (bước v) và ủ các mẫu trong vòng dưới 10 phút, cụ thể như 2-8 phút, 3-7 phút, 4-6 phút hoặc khoảng 5 phút.

Một cách khác là các bước iv) và v) diễn ra trong cùng một cột. Dòng mẫu trong trường hợp này được chia ra trước khi tiếp xúc với lipit sterol trong bước ii), để các bước ii) và iv) có thể diễn ra trong cùng một cột và bước ii) và v) có thể diễn ra trong một cột khác.

Mặc dù với lý do về khả năng lặp lại và độ tin cậy của phương pháp phát hiện, tốt nhất là trong bước v), một phần khác của mẫu đã phơi nhiễm với lipit sterol được phơi nhiễm với cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, cũng có thể bước phơi nhiễm phần mẫu nói trên với cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định và phần mẫu này được lưu trữ cho đến khi sử dụng tiếp, cụ thể như trong bước vi). Việc này có thể được thực hiện trong cùng một cột hoặc ống chứa, trong đó đã tiến hành ủ với lipit sterol.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bao gồm các bước sau:

i) chuẩn bị mẫu từ người hoặc động vật bị nghi ngờ mắc bệnh lao đang hoạt động;

ii) cho mẫu tiếp xúc với lipit sterol;

iii) thu được ít nhất hai phần của mẫu nói trên hoặc trước khi hoặc sau khi phơi nhiễm mẫu đó với lipit sterol;

iv) phơi nhiễm phần mẫu thứ nhất thu được với cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

v) giữ lại ít nhất một phần của phần mẫu thứ hai cho đến bước vi);

vi) phơi nhiễm ít nhất một phần mẫu đã được phơi nhiễm trong bước iv) với cơ chất xét nghiệm mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định và

phoi nhiễm ít nhất một phần mẫu đã được lưu trữ trong bước v) với cơ chất đối chứng mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

vii) phát hiện liên kết của kháng thể với kháng nguyên ở bước vi) trong xét nghiệm điểm cuối; và

viii) so sánh mức độ liên kết kháng thể kháng nguyên giữa xét nghiệm và đối chứng. Liên kết kháng nguyên kháng thể trong xét nghiệm ít hơn so với đối chứng cho thấy sự hiện diện của các kháng thể đối với kháng nguyên axit mycolic trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi nhiễm lao hoạt tính.

Trên cơ sở đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp tiền xử lý mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính để phát hiện bệnh:

i) chuẩn bị mẫu từ người hoặc động vật bị nghi ngờ mắc bệnh lao đang hoạt động;

ii) cho mẫu phoi nhiễm với lipit sterol;

iii) thu được ít nhất hai phần của mẫu nói trên hoặc trước khi hoặc sau khi phoi nhiễm mẫu đó với lipit sterol;

iv) phoi nhiễm phần mẫu thứ nhất thu được với cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

v) lưu giữ ít nhất một phần của phần mẫu thứ hai nói trên để tiếp tục sử dụng;

trong đó, sau khi phoi nhiễm trong bước iv) ít nhất một phần của phần mẫu thứ nhất được giữ lại để tiếp tục sử dụng.

Bước vi (phương pháp điểm cuối)

Trong bước này, các dòng mẫu đã phoi nhiễm lipit sterol được phân chia, hoặc được phoi nhiễm với dẫn xuất axit mycolic trong bước iv (dòng xét nghiệm) hoặc không được phoi nhiễm với dẫn xuất axit mycolic trong bước v (dòng đối chứng) được đưa đến các cơ chất tiếp theo, cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng tương

ứng, mang các dẫn xuất axit mycolic, tốt nhất là các dẫn xuất axit mycolic giống như ở bước iv.

Cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng có thể là cơ chất bất kỳ có thể mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định và từ đó có thể phát hiện liên kết giữa các kháng thể trong mẫu với các kháng nguyên nói trên.

Theo phương án thực hiện ưu tiên, việc phát hiện dấu hiệu bệnh được thực hiện bằng kỹ thuật lọc miễn dịch bằng hạt vàng. Trong xét nghiệm này, cơ chất xét nghiệm và đối chứng là một màng có lỗ nhỏ, tốt nhất là màng nitroxenluloza được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định.

Cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng có thể là các chất riêng biệt. Mặt khác, cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng có thể được nhận biết các vị trí khác nhau trên toàn bộ cơ chất. Cụ thể như, trong trường hợp màng có lỗ nhỏ, cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng có thể được tạo ra bởi màng có lỗ nhỏ thứ nhất (cụ thể như nitroxenluloza) và màng có lỗ nhỏ thứ hai (cụ thể như nitroxenluloza). Ngoài ra, cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng được gắn trên màng. Trong trường hợp đó, vùng xét nghiệm diễn ra tương tác kháng thể/kháng nguyên xảy ra (ví dụ tại chỗ) trên một vị trí của màng và vùng đối chứng diễn ra tương tác kháng thể/kháng nguyên có thể xảy ra ở vị trí khác của màng.

Bước vii và viii (phương pháp điểm cuối)

Trong bước vii, sự liên kết của các kháng thể với các kháng nguyên axit mycolic cố định được phát hiện theo phương pháp điểm cuối. Ít nhất một trong các phần mẫu đã được xử lý trước đó được xét nghiệm bằng phương pháp phát hiện điểm cuối. Có thể sử dụng toàn bộ phần mẫu để thực hiện phép thử nghiệm điểm cuối. Ngoài ra, phần mẫu được sử dụng để phát hiện liên kết của các kháng thể với các kháng nguyên axit mycolic được cố định trong phương pháp điểm cuối và một phần khác được lưu trữ để xét nghiệm sau còn tùy thuộc vào kết quả của phần đầu tiên của các phần mẫu.

Thuật ngữ “xét nghiệm điểm cuối” được hiểu là một xét nghiệm, trong đó kết quả được quan tâm là kết quả cuối cùng sau giai đoạn ủ xét nghiệm cố định, ngược lại phương pháp xét nghiệm thời gian thực. Trong trường hợp phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh của sáng chế, phương tiện dùng để thực hiện và kiểm tra các mẫu được xử lý thu được sau các bước iv) và v) cung cấp dấu hiệu về lượng kháng thể có trong các mẫu được xử lý sau các bước iv) và v).

Xét nghiệm phát hiện điểm cuối có thể phát hiện các thay đổi về màu sắc, huỳnh quang, hấp thụ hoặc phát quang khi kết thúc xét nghiệm. Trong việc phát hiện trong các xét nghiệm điểm cuối có thể được thực hiện bằng các phương pháp kỹ thuật phát hiện như quang phổ, kính hiển vi huỳnh quang, phát quang hoá học hoặc miễn dịch điện hóa phát quang. Điều này có thể bao gồm việc sử dụng các loại máy, ví dụ như máy đọc quang phổ / máy đo màu, máy đọc màng huỳnh quang hoặc máy đọc độ quang hóa.

Các xét nghiệm điểm cuối thích hợp có thể bao gồm xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), Western blot, xét nghiệm đánh dấu phóng xạ, xét nghiệm quang phổ hấp thụ, miễn dịch huỳnh quang, miễn dịch kết tủa, hóa mô miễn dịch, quang phổ tổng trở điện hóa (EIS).v.v... Ví dụ xét nghiệm ELISA liên quan đến ít nhất một kháng thể đặc hiệu với một kháng nguyên cụ thể. Trong trường hợp của sáng chế, kháng nguyên là một kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic và kháng thể là một kháng thể chống lại kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic.

Tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên có nguồn gốc từ mycolic trong phương pháp xét nghiệm điểm cuối có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kháng thể thứ cấp mà liên kết chuỗi nặng của kháng thể kháng lại dẫn xuất axit mycolic. Nhiều kháng thể thứ cấp phù hợp đã được thương mại hóa. Các kháng thể thứ cấp có thể được kết hợp với hạt, ví dụ hạt vàng, hoặc liên kết với liposom. Ví dụ về các kháng thể thứ yếu có thể là protein A hoặc G, có thể liên hợp với một enzym cho phép việc phát hiện liên kết.

Kỹ thuật hay phương pháp cụ thể phù hợp để phát hiện sự liên kết của các kháng thể với các kháng nguyên axit mycolic được cố định ở bước vii) là xét nghiệm

lọc miễn dịch bằng hạt vàng (IGFA), và cụ thể là xét nghiệm lọc đánh dấu miễn dịch bằng hạt vàng (DIGFA).

Xét nghiệm lọc miễn dịch bằng hạt vàng là xét nghiệm kết hợp kỹ thuật ELISA và các phương pháp lọc mẫu xét nghiệm bằng màng microporous, tốt nhất là màng nitroxenluloza, và được bọc bằng đầu dò bắt giữ trên màng. Đầu dò được đánh dấu bằng keo vàng được cho phép lọc qua màng microporous theo cách này. Bằng cách sử dụng màng microporous như chất mang cho đầu dò bắt giữ và lợi dụng tính chất mao dẫn và tính thấm thấu của màng, các kháng nguyên và kháng thể màng có thể dễ dàng phản ứng và có thể dễ dàng bị rửa hoặc khóa lại. Khi đầu dò được đánh dấu bằng hạt keo vàng liên kết với đầu dò bắt giữ trên màng thì có thể nhìn thấy bằng mắt thường chấm đỏ xuất hiện là tập hợp của các hạt vàng.

Xét nghiệm lọc miễn dịch bằng hạt vàng là phương pháp xét nghiệm đơn giản và nhanh chóng bởi vì không cần thiết bị gì ngoại trừ một màng và thuốc thử, và kết quả có thể được quan sát bằng mắt thường trong vòng vài phút.

Trong xét nghiệm lọc miễn dịch bằng hạt vàng, màng microporous có thể là màng nitroxenluloza, màng xenlulozo axetat hoặc màng PVDF với đường kính lỗ phù hợp. Tốt nhất là màng nitroxenluloza được sử dụng. Đường kính lỗ phù hợp là 0,2-5 μm .

Trong phương pháp điểm cuối, các kháng thể chứa trong một mẫu được phát hiện bằng các phương tiện của phương pháp xét nghiệm điểm cuối. Trong trường hợp xét nghiệm điểm cuối là phương pháp sử dụng xét nghiệm lọc miễn dịch bằng hạt vàng, cơ chất được đề cập trong các bước vi) và viii) của phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh của sáng chế, là màng microporous, tốt nhất là màng nitroxenluloza, được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định. Sau khi cố định kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic lên màng microporous, phần mẫu được tiền xử lý trong bước i) đến v) có thể được gắn lên màng. Sau khi thêm các phần mẫu và phản ứng của kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định với các kháng thể có trong các mẫu trên màng, các kháng thể thứ cấp được đánh dấu bằng hạt keo vàng được đưa lên màng để có sự kết tụ hạt vàng tại nơi xảy ra phản ứng kháng thể kháng

nguyên. Trong trường hợp này, sự kết tụ hạt vàng sẽ tạo ra các đám đỏ hoặc nâu có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Cường độ vùng phản ứng tỷ lệ thuận với lượng phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể, tức là lượng kháng thể trong mẫu tiền xử lý. Trong trường hợp cơ chất đối chứng cho thấy tín hiệu cường độ cao hơn cơ chất xét nghiệm thì đây là dấu hiệu cho biết bệnh lao đang hoạt động ở người được lấy mẫu. Mặt khác, trong trường hợp cơ chất đối chứng cho thấy không có sự khác nhau về tín hiệu cường độ màu (hoặc khác nhau không đáng kể) so với cơ chất xét nghiệm thì điều này chỉ ra rằng người hoặc động vật được lấy mẫu không nhiễm lao hoạt tính.

Trong các bước khác nhau của xét nghiệm lọc miễn dịch bằng hạt vàng, màng tế bào có thể được rửa với đệm thích hợp, ví dụ như đệm PBS. Dung dịch đệm có thể là đệm PBS/AE bao gồm NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 và EDTA trong nước ở pH sinh lý. Dung dịch đệm có thể là đệm PBS gồm 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 và 1,05 g Na_2HPO_4 hòa tan trong một lít nước cất hai lần, nước khử ion có chứa 1 mM EDTA và 0,025% (m/V) natri azit và được điều chỉnh đến pH 7,4.

Trong trường hợp sử dụng phương pháp DIGFA, màng microporous có thể được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic theo phương thức điểm đơn giản. Trong xét nghiệm DIGFA các mẫu đã được xử lý trước trong các bước i) đến vi) được đưa lên màng dưới dạng các điểm. Ngoài ra các kháng thể thứ hai được đánh dấu bằng keo vàng được thêm vào dưới dạng các điểm. Trong phương án thực hiện này, cơ chất đối chứng và cơ chất thử nghiệm tốt nhất là màng có lỗ nhỏ giống nhau với các chấm kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định trên nó. Phương pháp phát hiện của sáng chế có thể tiến hành phát hiện cả phần mẫu đối chứng và các phần mẫu xét nghiệm trên cùng một màng. Điều này nâng cao độ tin cậy của phép thử và hiệu quả về chi phí. Xét nghiệm DIGFA được đặc biệt ưa thích vì các kháng nguyên khác nhau có nguồn gốc từ các chủng mycobacteria khác nhau có thể được cố định tại các điểm khác nhau trên một số màng. Bằng cách này, sẽ có thể cung cấp thông tin về chủng vi khuẩn gây bệnh cho người bệnh. Một lợi thế khác của việc sử dụng DIGFA là các mẫu lấy từ những người khác nhau nghi nhiễm lao hoạt tính có thể được so sánh trong cùng một xét nghiệm bởi vì DIGFA cho phép phát hiện nhanh

và đáng tin cậy sự tương tác kháng thể kháng nguyên mà không giới hạn số lượng và chỉ tùy thuộc vào kích thước của màng.

Việc phát hiện sự liên kết của các kháng thể và vật liệu khác với kháng nguyên axit mycolic, cụ thể như sự nhuộm màu đỏ trong trường hợp xét nghiệm DIGFA được sử dụng làm phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh có thể được thực hiện trong một thiết bị tự động. Có nhiều thiết bị tự động được người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật biết đến và có thể lựa chọn các công cụ phần mềm phù hợp để thực hiện việc so sánh ở bước viii) về mức độ liên kết kháng thể kháng nguyên giữa cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng. Bất cứ sự nhận thấy nào mà chỉ ra liên kết trong cơ chất xét nghiệm ít hơn so với đối chứng cho thấy sự hiện diện của các kháng thể đối với kháng nguyên trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi nhiễm lao hoạt tính. Trong trường hợp này, cần hiểu rằng sự ít hơn có thể được hiểu là về chất lượng và số lượng, tức là liên kết ít hơn có thể được hiểu là có số lượng liên kết ít hơn và có sự liên kết yếu hơn.

Việc phát hiện việc liên kết các kháng thể và các chất khác với kháng nguyên axit mycolic có thể được thực hiện bằng kỹ thuật phát hiện trực quan hoặc kỹ thuật phát hiện phù hợp bất kỳ. Theo phương án thực hiện của sáng chế, việc phát hiện dấu hiệu bệnh bằng phương pháp xét nghiệm điểm cuối được thực hiện trực quan, tốt nhất là bằng mắt thường. Điều này có lợi thế là dễ phát hiện mà không cần đến công nghệ phát hiện đắt tiền và phức tạp.

Trong trường hợp sử dụng phương pháp DIGFA, liên kết kháng nguyên kháng thể và/hoặc các chất khác với kháng nguyên axit mycolic có thể được đánh giá bằng mắt thường.

Một tín hiệu trực quan, cụ thể như sự nhuộm màu đỏ trong xét nghiệm điểm cuối sử dụng phương pháp DIGFA, cũng có thể được phát hiện với sự trợ giúp của một ứng dụng di động, tức là một chương trình máy tính được thiết kế để chạy trên các thiết bị di động như máy tính bảng hoặc điện thoại thông minh. Cụ thể, ứng dụng này được thiết kế để so sánh tín hiệu liên kết của cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối

chứng và cho biết liệu người hoặc động vật được lấy mẫu xét nghiệm đó có nhiễm lao hoạt tính hay.

Hệ thống

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một hệ thống hoặc thiết bị, tốt nhất là hệ thống hoặc thiết bị xách tay, dùng để thực hiện phương pháp điểm cuối trong phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động. Hệ thống có thể được chia nhỏ thành 1) hệ thống hoặc thiết bị tiền xử lý dòng mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động để xử lý mẫu cho phù hợp với việc phát hiện bằng phương pháp của sáng chế; và 2) các phương tiện phát hiện để cho phép phát hiện tương tác của các khác thể có trong mẫu đã tiền xử lý.

Theo phương án thực hiện, hệ thống bao gồm ít nhất một ống chứa có chứa lipit sterol được bố trí và cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu từ người và động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động; các phương tiện để chia dòng mẫu thành ít nhất một dòng mẫu thứ nhất và một dòng mẫu thứ hai; các phương tiện này hoặc được kết nối hoặc ở phía trước hoặc ở phía sau của ít nhất một ống chứa có chứa lipit sterol; ống chứa thứ hai tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất được kết nối ở phía sau với ống chứa có chứa lipit sterol, và có chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; ống chứa thứ ba tiếp nhận dòng mẫu thứ hai được bố trí song song với ống chứa thứ hai và ở phía sau ống chứa thứ nhất có chứa lipit sterol; và bao gồm cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, và cơ chất phát hiện thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ nhất và cơ chất phát hiện thứ hai mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ hai.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, hệ thống thực hiện phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động bao gồm ít nhất một ống chứa có chứa lipit sterol được bố trí và cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu từ người và động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động; các phương tiện để phân chia dòng mẫu thành ít nhất một dòng mẫu thứ nhất và một dòng mẫu thứ hai; các phương tiện này được kết nối

hoặc ở phía trước hoặc ở phía sau của ít nhất một ống chứa có chứa lipit sterol nói trên; ống chứa thứ hai có chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, được kết nối ở phía sau ống chứa thứ nhất có chứa lipit sterol để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất; ống chứa thứ ba được bố trí song song với ống chứa thứ hai và được kết nối ở phía sau ống chứa thứ nhất có chứa lipit sterol để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai; bao gồm cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, và cơ chất phát hiện thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ nhất từ ống chứa thứ hai, và cơ chất phát hiện thứ hai mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ hai từ ống chứa thứ ba, trong đó cơ chất phát hiện thứ nhất và thứ hai là màng microporous.

Tốt nhất là, cơ chất phát hiện thứ nhất và cơ chất phát hiện thứ hai là màng microporous, màng microporous tốt nhất là màng nitroxenluloza. Cơ chất phát hiện thứ nhất và cơ chất phát hiện thứ hai trong trường hợp này có các điểm riêng biệt, cụ thể là các điểm phát hiện thứ nhất và thứ hai, trên cùng một màng. Do đó, cùng một phương pháp và trên cùng một màng có thể được sử dụng để phát hiện tương tác kháng thể/kháng nguyên. Điều này làm tăng độ tin cậy của việc phát hiện và đơn giản hóa việc so sánh sự tương tác được phát hiện trên cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng. Hơn nữa, điều này cho phép nhiều mẫu có thể được xét nghiệm đồng thời.

Các cơ chất phát hiện không có mối liên kết vật lý với các thành phần khác của hệ thống. Cụ thể là, các mẫu thu được sau khi đi qua các ống chứa thứ hai và thứ ba có thể được lưu trữ lại cho đến khi tiếp tục được sử dụng hoặc để chuyển đến cơ chất phát hiện. Bằng cách này, người thực hiện có sự linh hoạt trong việc lập kế hoạch xét nghiệm. Cụ thể, điều này cho phép tiền xử lý mẫu từ một số đối tượng được thu thập, rồi tất cả các mẫu được xét nghiệm một lần trên một vật liệu cơ chất. Điều này cũng cho phép dễ dàng xét nghiệm các mẫu từ nhiều bệnh nhân trong cùng một điều kiện.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hệ thống hoặc thiết bị, tốt nhất là hệ thống hoặc thiết bị xách tay, dùng để tiền xử lý dòng mẫu từ người hoặc động vật nghi mắc bệnh lao đang hoạt động để xử lý mẫu cho phù hợp với việc phát

hiện trong phương pháp phát hiện, bao gồm ít nhất một ống chứa có chứa lipit sterol được bố trí và cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động; các phương tiện để phân chia dòng mẫu thành ít nhất một dòng mẫu thứ nhất và một dòng mẫu thứ hai; các phương tiện được kết nối hoặc ở phía trước hoặc ở phía sau của ít nhất một ống chứa có chứa lipit sterol; ống chứa thứ hai có chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định được kết nối ở phía sau ống chứa thứ nhất có chứa lipit sterol để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất; ống chứa thứ ba được bố trí song song với ống chứa thứ hai và được kết nối ở phía sau ống chứa thứ nhất có chứa lipit sterol để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai; và bao gồm cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, và phương tiện để lưu trữ hoặc chuyển các mẫu đã xử lý. Các phương tiện này không được kết nối vật lý với các ống chứa có chứa cơ chất thứ nhất và cơ chất thứ hai tương ứng và được định vị ở phía sau của các ống chứa khi hệ thống được sử dụng để tiếp nhận các phân mẫu đã tiền xử lý.

Theo phương án thực hiện, hệ thống hoặc thiết bị tiền xử lý dòng mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động để xử lý mẫu cho phù hợp với việc phát hiện theo phương pháp của sáng chế có thể bao gồm hai cột. Mỗi cột bao gồm hai ngăn hoặc hai ống chứa. Một ngăn hoặc ống chứa trên chứa cơ chất được phủ lipit sterol, cụ thể như các hạt được phủ cholesterol. Ngăn dưới của một trong hai cột có chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, và ngăn dưới của cột còn lại có chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định.

Theo khía cạnh này, sáng chế đề xuất hệ thống tiền xử lý dòng mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động, hệ thống bao gồm các phương tiện để phân chia dòng mẫu thành ít nhất một dòng mẫu thứ nhất và một dòng mẫu thứ hai, ít nhất một cột thứ nhất và một cột thứ hai, được cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và dòng mẫu thứ hai tương ứng; cột thứ nhất bao gồm một ngăn chứa lipit sterol và ngăn còn lại chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định nằm ở phía dưới của ngăn chứa lipit sterol; và cột thứ hai bao gồm một ngăn chứa lipit sterol và ngăn còn lại chứa cơ chất thứ

hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định nằm ở phía dưới của ngăn chứa lipit sterol; và các phương tiện để lưu trữ hoặc chuyển các mẫu đã xử lý đi qua các cột nói trên. Các phương tiện để lưu trữ hoặc chuyển không kết nối vật lý với các ống chứa có chứa cơ chất thứ nhất và thứ hai tương ứng, và được đặt ở phía sau của các cột khi hệ thống được sử dụng để tiếp nhận các phân mẫu được tiền xử lý.

Nguyên tắc này có thể được áp dụng cho hệ thống thực hiện phương pháp điểm cuối để phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động. Theo khía cạnh này, sáng chế đề xuất hệ thống thực hiện phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động ở mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động, hệ thống bao gồm các phương tiện để phân chia dòng mẫu thành ít nhất một dòng mẫu thứ nhất và một dòng mẫu thứ hai, ít nhất một cột thứ nhất và một cột thứ hai, được cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và dòng mẫu thứ hai tương ứng; cột thứ nhất bao gồm một ngăn chứa lipit sterol và ngăn còn lại chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định nằm ở phía dưới của ngăn chứa lipit sterol; và cột thứ hai bao gồm một ngăn chứa lipit sterol và ngăn còn lại chứa cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định nằm ở phía dưới của ngăn chứa lipit sterol; và cơ chất phát hiện thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ nhất và cơ chất thứ hai mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ hai.

Tốt nhất là, hệ thống hoặc thiết bị bao gồm một đầu xuyên qua da được kết nối với ống dẫn thứ nhất được bố trí và cấu hình để tiếp nhận dòng máu từ đầu xuyên qua da và để đưa dòng máu từ vị trí trên da đến ống chứa/ngăn có chứa lipit sterol.

Theo phương án thực hiện ưu tiên, hệ thống hoặc thiết bị bao gồm bộ phận lọc được kết nối với ống dẫn thứ nhất để tiếp nhận dòng máu và được cấu hình để tách huyết tương từ mẫu máu toàn phần.

Theo một phương án thực hiện khác, hệ thống hoặc thiết bị bao gồm đầu xuyên qua da được kết nối với ống dẫn thứ nhất được bố trí và cấu hình để tiếp nhận dòng

máu từ đầu xuyên qua da và để đưa dòng máu ra khỏi vị trí trên da; một bộ phận lọc được kết nối với ống dẫn thứ nhất để tiếp nhận dòng máu và được cấu hình để tách huyết tương từ mẫu máu toàn phần; ống chứa thứ nhất để tiếp nhận mẫu, ống chứa có chứa lipit sterol; các phương tiện để chia mẫu thành ít nhất một dòng mẫu thứ nhất và một dòng mẫu thứ hai; ống chứa thứ hai để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất, ống chứa thứ hai có chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; ống chứa thứ ba để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai, ống chứa thứ ba có chứa cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và các phương tiện để lưu trữ hoặc chuyển mẫu đã xử lý.

Dòng đi qua hệ thống hoặc thiết bị tốt nhất là được bơm bằng máy bơm, bơm tốt nhất là bơm liên tục, cụ thể như bơm nhu động hoặc bơm màng. Trong trường hợp cột được sử dụng, dòng mẫu có thể được dẫn bởi lực hấp dẫn hoặc mao dẫn.

Phương tiện xuyên qua da có thể là phương tiện bất kỳ phù hợp để lấy dòng máu từ người hoặc động vật, cụ thể như bơm kim tiêm hoặc dụng cụ tương tự.

Ống dẫn thứ nhất có kích thước phù hợp với mục đích của thiết bị, tức là nó cần phải lắp vừa với phương tiện xuyên qua da và ống chứa thứ nhất.

Các thành phần của thiết bị hoặc hệ thống, cụ thể là ống chứa, phương tiện để pha loãng và bộ lọc có thể được kết nối với nhau bằng các ống nối thích hợp. Ngoài ra, các thành phần của thiết bị có thể được thiết kế để chúng có thể được kết nối trực tiếp với nhau, và được ngăn cách bởi các bộ lọc cho mẫu đi qua một cách có chọn lọc nhưng không có cơ chất đi qua. Vật liệu làm ống được sử dụng theo sáng chế có thể là vật liệu phù hợp bất kỳ được biết đến bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực xét nghiệm mẫu máu. Các vật liệu phù hợp với các thành phần máu/huyết tương/huyết thanh và bao gồm polytetrafluoroetylen (Teflon®), polypropylen, polyetekton và polyetylen.

Các thành phần khác có thể được kết nối giữa các thành phần của thiết bị. Các thành phần khác có thể được kết nối trong các ống nối các thành phần được gắn trực tiếp vào các thành phần.

Hệ thống hoặc thiết bị phụ để thực hiện các bước i-v của phương pháp theo sáng chế cũng có thể bao gồm các phương tiện dùng để pha loãng máu hoặc huyết tương. Các phương tiện này có thể được lắp đặt trước ống chứa có chứa lipit sterol, trước bộ lọc, giữa bộ lọc và ống chứa có chứa lipit sterol, giữa ống chứa có chứa lipit sterol và các ống chứa khác (thứ hai và thứ ba) hoặc giữa ống chứa thứ hai/thứ ba và cả phương tiện lưu trữ và chuyển. Cụ thể là một ống chứa 10 ml có thể được lắp đặt ở đầu ra của ống chứa thứ hai hoặc ống chứa thứ ba. Dung dịch đệm phù hợp có thể có sẵn trong ống chứa hoặc được bổ sung vào ống chứa để có độ pha loãng mong muốn. Theo cách này, thể tích mẫu được giữ ở mức thấp nhất có thể trong hầu hết các bước của các phương pháp theo sáng chế, điều này có lợi cho tốc độ xét nghiệm của quy trình và độ nhỏ gọn của thiết bị theo sáng chế.

Bộ lọc có thể bao gồm lưới lọc. Tốt nhất là, bộ lọc được lắp đặt trên một vi mạch bộ lọc để có được bộ lọc nhỏ gọn.

Các ống chứa có thể là lọ, ống dẫn dạng máng hoặc ống dẫn tròn, cụ thể như ống máng xoắn ốc hoặc ống xoắn ốc. Một ống máng xoắn hoặc ống xoắn ốc là tốt nhất vì cấu trúc như vậy cần ít không gian trong khi vẫn duy trì một con đường dòng chảy dài. Một ống máng xoắn hoặc ống xoắn có thể được lắp đặt dễ dàng trên một vi mạch. Điều này góp phần làm nhỏ gọn thiết bị theo sáng chế. Thuật ngữ “ống chứa” phải được diễn giải theo nghĩa rộng, cụ thể là, nó có thể được nhìn thấy dưới dạng khu vực được xác định trong một bộ phận khác, tức là một ngăn, cụ thể như một ngăn của cột. Do đó, thuật ngữ “ống chứa” và “ngăn” có thể được sử dụng hoán đổi cho nhau trong phần mô tả sáng chế. Điều quan trọng là ống chứa có chứa lipit sterol và các ống chứa khác (ống chứa thứ hai và thứ ba) tách rời về không gian. Vì vậy, một ống chứa có chứa sterol có thể nằm trong một cột cùng với ống chứa khác (ống chứa thứ hai) trong khi một ống chứa có chứa sterol khác có thể nằm trong một cột cùng với một ống chứa khác nữa (ống chứa thứ ba). Theo sáng chế, cột để chuẩn bị dòng được xét nghiệm trên cơ chất xét nghiệm có thể bao gồm cơ chất trên (hoặc phía trước) được phủ lipit sterol được tách biệt bởi tấm chắn, nhưng liên thông trong dung dịch lỏng với cơ chất dưới (hoặc phía sau) được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic. Cột để chuẩn bị dòng được xét nghiệm trên cơ chất đối chứng có thể bao

gồm cơ chất trên (hoặc phía trước) được phủ lipit sterol được tách biệt bởi tấm chắn, nhưng liên thông trong dung dịch lỏng với cơ chất dưới (hoặc phía sau) không được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic. Cần lưu ý rằng “liên thông” trong ngữ cảnh này có nghĩa là mẫu được xét nghiệm có thể đi qua tấm chắn, trong khi tấm chắn không cho phép cơ chất đi qua. Các cơ chất phù hợp cho cột là các hạt. Theo phương án thực hiện của sáng chế, hệ thống để tiền xử lý dòng mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động để tạo ra mẫu phù hợp cho việc phát hiện bằng phương pháp của sáng chế bao gồm ít nhất một cột thứ nhất và một cột thứ hai, được cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và dòng mẫu thứ hai tương ứng, cột thứ nhất bao gồm ống chứa có chứa lipit sterol và ống chứa thứ hai có chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, và cột thứ hai bao gồm ống chứa có chứa lipit sterol và ống chứa thứ ba có chứa cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định.

Tốt nhất là, vật liệu của các ống chứa giống nhau và các vật liệu phù hợp có thể là thủy tinh bk-7, polytetrafluorethylen, polypropylen, polyete keton hoặc polyetylen. Ranh giới giữa hai ống chứa có thể là bộ lọc không cho phép vật liệu cơ chất đi qua, nhưng cho phép dòng mẫu đi qua. Các cơ chất của ống chứa phải là vật liệu trơ đối với các liên kết không đặc hiệu của các phân tử trong mẫu, cụ thể là thủy tinh bk-7, polytetrafluorethylen, polypropylen, polystyren, polyete keton hoặc polyetylen. Cơ chất có thể ở dạng hạt, hạt có liên kết ngang bất kỳ, cụ thể là hạt polystyren.

Thiết bị của sáng chế bao gồm một ống chứa có chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định (ống chứa thứ hai) và một ống chứa có chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định. Thay vì kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, ống chứa sau có thể được phủ cơ chất trơ hoặc không được phủ, miễn là không có liên kết đặc hiệu nào xảy ra.

Các phương tiện lưu trữ hoặc chuyển mẫu đã xử lý có thể là các lọ nhỏ trong đó mẫu có thể được lưu trữ để phân tích tiếp, cụ thể như bằng kỹ thuật lọc miễn dịch bằng hạt vàng. Ngoài ra, các phương tiện cso thể được tạo ra bởi pipet có thể được sử dụng để chuyển các phần mẫu đã xử lý trong bước i)-v) của phương pháp theo

sáng chế đến các cơ chất với kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định của xét nghiệm điểm cuối, cụ thể là đến các phần đánh dấu dưới dạng chấm trong kỹ thuật lọc miễn dịch bằng hạt vàng.

Thiết bị/hệ thống có thể được kết nối đến các phương tiện phân tích tự động phù hợp bất kỳ, cụ thể như máy vi tính với chương trình phần mềm phù hợp để thực hiện so sánh liên kết của kháng thể axit mycolic với kháng nguyên được cố định trên cơ chất.

Một phương án thực hiện mẫu của hệ thống theo điểm yêu cầu bảo hộ 32 được minh họa trên Fig.2.

Fig.2 minh họa kim xuyên qua da 101 được kết nối với ống dẫn thứ nhất 102 được bố trí và cấu hình để tiếp nhận máu từ kim 101 và mang lượng máu ra khỏi vị trí da. Ống dẫn 102 được kết nối với bộ phận lọc 103. Bộ phận lọc có vai trò tách huyết tương từ mẫu máu toàn phần. Qua ống dẫn 113, bộ phận lọc 103 được kết nối đến ống chứa thứ nhất 104 có dạng ống máng xoắn có thành trong được phủ lipit sterol. Qua ống dẫn 114, ống máng xoắn 104 được kết nối với phương tiện chia huyết tương 105 có dạng điểm phân nhánh van tự động. Một nhánh của điểm phân nhánh được kết nối qua ống dẫn 116 đến ống chứa thứ hai 106 để tiếp nhận dòng huyết tương thứ nhất, ống chứa 106 có chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định. Nhánh còn lại của điểm phân nhánh được kết nối qua ống dẫn 115 đến ống chứa thứ ba 107 để tiếp nhận dòng huyết tương thứ hai, ống chứa thứ ba 107 có chứa cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định. Các ống chứa 106 và 107 theo phương án thực hiện có dạng ống máng xoắn có thành trong hoặc được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic (ống chứa 106) hoặc không được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic (ống chứa 107). Các ống chứa 106 và 07 được kết nối qua các ống dẫn 117 và 118 tương ứng đến các ống pha loãng 111 và 112 tương ứng. Các ống pha loãng 111 và 112 có thể chứa sẵn đệm pha loãng phù hợp, các ống pha loãng 111 và 112 bao gồm các miệng nạp 121 và 122 tương ứng để dẫn đệm pha loãng vào. Các ống pha loãng 111 và 112 có thể được kết nối qua các ống dẫn 119 và 120 tương ứng đến phương tiện lưu trữ hoặc chuyển 108 và 109 tương ứng. Ngoài ra, các ống pha loãng

111 và 112 có thể được kết nối qua các ống dẫn 119 và 120 tương ứng đến cơ chất xét nghiệm và cơ chất đối chứng với kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định được xét nghiệm trong xét nghiệm điểm cuối.

Bộ kit

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ kit để sử dụng trong chẩn đoán bệnh lao hoặc tiền xử lý mẫu cho chẩn đoán bệnh lao, bao gồm một hoặc nhiều phương tiện xuyên qua da; một hoặc nhiều ống nối; một hoặc nhiều ống chứa được phủ lipid sterol và chất bất kỳ bao gồm photphatidyl cholin, pectin, amphotericin B hoặc β -cyclodextrin; một hoặc nhiều ống chứa chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; một hoặc nhiều ống chứa có chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; tùy chọn một hoặc nhiều ống chứa để chuyển và lưu trữ mẫu; tùy chọn phương tiện để pha loãng máu hoặc huyết tương và/hoặc bộ phận lọc; ít nhất một màng microporous với kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định trên đó, và tùy chọn các kháng thể thứ cấp liên kết với chuỗi nặng của các kháng thể kháng lại kháng nguyên có nguồn gốc mycolic có trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động, tốt nhất là kháng thể thứ cấp được đánh dấu bằng hạt keo vàng.

Theo phương án thực hiện ưu tiên, bộ kit bao gồm: một hoặc nhiều phương tiện xuyên qua da; một hoặc nhiều ống nối; một hoặc nhiều cột, bao gồm một ngăn có chứa cơ chất được phủ lipid sterol và chất bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm phosphatidyl cholin, pectin, amphotericin B và β -cyclodextrin, và một ngăn có chứa cơ chất được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định ở bên dưới ngăn có chứa cơ chất được phủ lipid sterol nói trên; một hoặc nhiều cột, bao gồm một ngăn có chứa cơ chất được phủ lipid sterol và chất bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm phosphatidyl cholin, pectin, amphotericin B và β -cyclodextrin, và một ngăn có chứa cơ chất không được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định ở bên dưới ngăn có chứa cơ chất được phủ lipid sterol nói trên; tùy chọn một hoặc nhiều ống chứa để chuyển và lưu trữ mẫu; tùy chọn phương tiện để pha loãng máu hoặc huyết tương và/hoặc bộ phận lọc; tùy chọn ít nhất một màng microporous với kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định trên đó, và tùy chọn các kháng thể thứ cấp

liên kết với chuỗi nặng của các kháng thể kháng lại kháng nguyên có nguồn gốc mycolic có trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động.

Bộ kit cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều phương tiện để chuyển các phần mẫu đã tiền xử lý theo các bước i)-v) của phương pháp theo sáng chế đến màng microporous, cụ thể là một pipet và phụ kiện pipet, cụ thể là đầu côn pipet.

Bộ kit cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều phương tiện để lưu trữ các phần mẫu đã tiền xử lý theo các bước i)-v) để sử dụng tiếp, cụ thể như lọ hoặc ống chứa.

Bộ kit cũng có thể bao gồm các công cụ để lắp ráp các thành phần, chẳng hạn như vít, kẹp, keo, băng, tua vít, v.v...

Bộ kit cũng có thể chứa các phương tiện để pha loãng máu hoặc huyết tương trong suốt quá trình phân tích máu. Cụ thể là ống chứa (ví dụ có thể tích 10 ml) được đặt tại đầu ra của ống chứa thứ hai và thứ ba. Một đệm thích hợp có thể có sẵn trong ống chứa hoặc được thêm vào ống chứa để tạo ra độ pha loãng mong muốn.

Các thành phần của bộ kit cho phép người thực hiện xét nghiệm chẩn đoán bệnh lao lắp ráp hệ thống của sáng chế tại chỗ, tức là tại điểm mong muốn. Do đó cần hiểu rằng các thành phần của bộ kit có cùng đặc tính và các tính chất ưu việt như đã giải thích ở trên đối với thiết bị của sáng chế. Hệ thống của sáng chế dễ dàng được lắp ráp từ các thành phần của bộ kit theo sáng chế, tức là không yêu cầu kỹ thuật chuyên môn. Bộ kit có thể được cung cấp một cách tiện lợi với các hướng dẫn lắp ráp và sử dụng.

Lipit sterol

Lipit sterol được sử dụng theo sáng chế tốt nhất là cholesterol hoặc dẫn xuất của nó. Lipit sterol cũng có thể là sterol phospholipit cải biến. Sterol-lipit cải biến có thể là sterol-phospholipit cải biến, cụ thể như sterol-phosphatidylcholin cải biến hoặc glyxerophospholipit. Đối với lipit sterol cải biến, sterol tốt nhất là cholesterol. Một ví dụ điển hình của lipit sterol cải biến phù hợp cho mục đích của sáng chế là 1-palmitoyl-2-colesteryl carbonoyl-sn-glyxero-3-phosphocholin.

Lipit sterol tốt nhất là được cố định trên bề mặt. Một ví dụ là cơ chất có lớp phủ chứa cholesterol hoặc este cholesterol trong đó este cholesterol là cholesterol linoleat, trong đó tỷ lệ trọng lượng của axit linoleic so với cholesterol trong khoảng 1:3-1:20.

Cơ chất cũng có thể được phủ lipit sterol, tốt nhất là cholesterol, kết hợp với phân tử khác.

Tốt nhất là, lipit sterol là cholesterol được cố định trên cơ chất cùng với phosphatidyl cholin. Lipit sterol loại bỏ các kháng thể kháng cholesterol khỏi máu/huyết tương/huyết thanh nếu không các kháng thể này sẽ phản ứng chéo với các kháng nguyên axit mycolic trên cơ chất và dẫn đến chẩn đoán dương tính giả bệnh lao. Phosphatidyl cholin sẽ gắn với chất kỵ nước trong mẫu máu, làm cho mẫu có tính ưa nước sau khi phơi nhiễm. Mẫu ưa nước thu được sẽ được xử lý dễ dàng hơn trong các bước tiếp theo và ít bị đông tụ hơn.

Theo một phương án thực hiện, lipit sterol tốt nhất là cholesterol được cố định cùng với pectin trên cơ chất, cụ thể là thành trong của ống. Theo phương án thực hiện, lipit sterol loại bỏ các kháng thể kháng cholesterol khỏi máu/huyết tương/huyết thanh nếu không các kháng thể này sẽ phản ứng chéo với các kháng nguyên axit mycolic trên cơ chất và dẫn đến chẩn đoán dương tính giả bệnh lao. Ngoài ra, pectin loại bỏ cholesterol ra khỏi mẫu cũng như kháng thể cholesterol. Điều này dẫn đến phương pháp phát hiện bệnh lao có độ tin cậy cao hơn nữa.

Ngoài ra, lipit sterol tốt nhất là cholesterol được cố định với hợp chất liên kết với cholesterol trong mẫu có nguồn gốc từ máu, cụ thể là cholesterol liên kết heteropolysaccarit, cụ thể như β -cyclodextrin, pectin, amphotericin B hoặc dextrin. Các phân tử này loại bỏ cholesterol khỏi mẫu cũng như kháng thể cholesterol. Điều này dẫn đến phương pháp phát hiện bệnh lao có độ tin cậy cao hơn nữa.

Đối với lipit sterol, tốt nhất là cholesterol được cố định với β -cyclodextrin hoặc pectin, amphotericin B trên cơ chất, cụ thể như màng polypropylen sợi rỗng hoặc thủy tinh.

Nhiều phương pháp được biết đến để cô định lipit sterol, cụ thể là cholesterol lên cơ chất. Người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể lựa chọn quy trình phù hợp để phủ cơ chất. Cụ thể, việc phủ có thể được thực hiện bằng cách, đầu tiên hòa tan cholesterol trong dung môi hữu cơ, tiếp đó pha loãng cholesterol đã hòa tan trong dung dịch etanol, cho dung dịch bay hơi tại chỗ trong ống chứa, rửa lớp phủ bằng nước muối đậm, làm khô ống chứa bằng không khí, và bọc kín ống chứa trong bao bì chống hơi nước có chứa chất khử mùi.

Kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic

Các kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic có thể có nguồn gốc từ mycobacteria được chọn từ mycobacteraia độc hại và gây bệnh. Tốt nhất là, kháng nguyên axit mycolic có nguồn gốc từ *Mycobacteriu tuberculosis*. Kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic ít nhất là một loại được chọn từ nhóm bao gồm axit mycolic, yếu tố thừng, axit mycolic cải biến hóa học, yếu tố thừng cải biến hóa học, dẫn xuất axit mycolic tổng hợp, dẫn xuất yếu tố thừng tổng hợp.

Nguồn tự nhiên của dẫn xuất axit mycolic bao gồm thành tế bào của mycobacteria, cụ thể là *Mycobacterium buberculosis* bao gồm hỗn hợp nhiều lớp hợp chất khác nhau và các đồng đẳng axit mycolic khác nhau, thường là các dẫn xuất mà trong đó chúng được liên kết với thành tế bào.

Ngoài bản thân các axit mycolic, tế bào mycobacteria cũng bao gồm các hợp chất có nguồn gốc từ axit, cụ thể như este đường của axit mycolic. Các este đường xuất hiện trong tự nhiên như trehaloza-6,6-dimycolat (thường được gọi là TDM), còn được gọi là “yếu tố thừng”; và trehaloza monomycolat (thường được gọi là TMM). Các este đường xuất hiện trong tự nhiên dưới dạng hỗn hợp phức tạp của nhiều lớp axit mycolic khác nhau và nhiều đồng đẳng khác nhau trong mỗi lớp.

Bởi vì rất khó định danh các yếu tố thừng có mặt trong các sản phẩm tự nhiên và phân biệt các phân tử riêng biệt, nên tốt hơn là sử dụng các dẫn xuất axit mycolic bán tổng hợp, và tốt nhất là sử dụng các dẫn xuất axit mycolic tổng hợp cho mục đích của sáng chế. Hơn nữa, người ta đã biết rằng cấu trúc của đơn vị axit mycolic ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của yếu tố thừng. Do đó, khi dẫn xuất axit mycolic tự

nhiên được sử dụng, thì có sự khác biệt về hoạt tính sinh học giữa các dẫn xuất này, và như vậy việc phát hiện liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên trong mẫu có thể không thể đoán trước được và kết quả phát hiện trở nên thiếu độ tin cậy. Ngoài ra, sai lệch trong việc chuẩn bị các dẫn xuất axit mycolic tự nhiên có thể dẫn đến vấn đề trong việc lặp lại các lô thí nghiệm khác nhau.

Do đó, để có thể phát hiện bệnh với độ tin cậy cao và kết quả lặp lại, tốt hơn là sử dụng dẫn xuất axit mycolic bán tổng hợp, và tốt nhất là sử dụng dẫn xuất axit mycolic tổng hợp vốn giống như hoặc gần giống một hợp chất duy nhất được tìm thấy trong hỗn hợp tự nhiên.

Các dẫn xuất bán tổng hợp phù hợp bao gồm các yếu tố thường bán tổng hợp có thể được điều chế bằng cách gắn axit mycolic với nhóm đường. Tuy nhiên, yếu tố bán tổng hợp vẫn bao gồm hỗn hợp của nhiều đồng đẳng khác nhau.

Do đó, dẫn xuất axit mycolic phù hợp để sử dụng theo sáng chế là các yếu tố thường tổng hợp, cụ thể là các yếu tố thường tổng hợp được mô tả trong sáng chế WO 2010/08667, cụ thể hơn là các hợp chất có công thức $(M)_x(S)_y(M')_z$, trong đó x bằng 1-6, y bằng 1-12, z bằng 0-10, mỗi M và mỗi M' độc lập với nhau là dư lượng axit mycolic bao gồm một nửa axit β -hydroxy và mỗi S là một đơn vị monosaccarit.

Kháng nguyên axit mycolic có thể là dạng được chọn từ hỗn hợp hợp chất đồng nhất và không đồng nhất. Kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic có thể được sử dụng kết hợp với một phospholipit, cụ thể như phosphatidylcholin.

Kháng nguyên axit mycolic có thể được cố định trên cơ chất theo nhiều cách đã được biết đến bởi người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic có thể được tổng hợp với nhóm hoạt tính cụ thể cho phép cố định vào vật liệu cơ chất.

Cụ thể như, đối với cố định trên silic dioxit, thì hóa học bắt cặp silan có thể được sử dụng.

Trong trường hợp cơ chất nitroxenluloza, kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic có thể được cố định như sau. Kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic có

thể được thu nhận ở dạng đông khô và được hoàn nguyên trong hỗn hợp dung môi, cụ thể như hỗn hợp clorofom:metanol:nước, và được pha loãng đến nồng độ một vài nanomol, cụ thể như 1nM. Dịch pha loãng có thể được phát hiện trên màng notroxenluloza, trong đó mỗi chấm được tách rời ở khoảng cách xác định trước, cụ thể như 1 cm. Sau khi sấy khô các chấm, kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định trên màng. Các phương pháp cố định khác cũng có liên quan đến việc hòa tan kháng nguyên trong hexan hoặc PBS nóng để tạo thành dung dịch phủ kháng nguyên trước khi phát hiện dung dịch trên màng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây nhằm làm rõ nguyên tắc của sáng chế và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Trong ví dụ, mẫu huyết thanh người được xét nghiệm cho kháng thể kháng lại dẫn xuất axit mycolic trong xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết enzym (ELISA). Là một phương pháp phát hiện, phương pháp ELISA đã được chọn bởi vì nó ít nhạy hơn so với một số phương pháp như quang phổ cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc quang phổ tổng trở điện hóa hoặc cộng hưởng vòng. Do đó, có thể kết luận rằng nếu đạt được kết quả khả quan với ELISA, các phương pháp phát hiện nhạy hơn cũng thu được kết quả tốt.

Vật liệu

- Mẫu (huyết tương hoặc huyết thanh người)
- Bộ lọc xoay 0,2 μm (Whatman)
- Axit mycolic và hạt gắn cholesterol
- Axit mycolic đa dòng được hòa tan trong hexan
- Đĩa ELISA polystyren
- PBS
- Đệm ngăn ngừa phản ứng: 0.5% casein trong PBS

- Dung dịch cơ chất tạo màu TMB-ELISA (Thermo Scientific)
- Axit sulfuric 2M
- Kháng thể thứ cấp: kháng thể thỏ kháng IgG người HRP (DAKO)

Quy trình

Phủ đĩa ELISA

Mỗi giếng của các đĩa ELISA 96 giếng được bổ sung 50 μ l hexan với axit mycolic đa dòng ở nồng độ 3 μ g/ml/ Hexan không có axit mycolic được sử dụng làm đối chứng. Các đĩa được ủ trong 24 giờ ở 4°C và sau đó được rửa hai lần bằng PBS.

Chuẩn bị các hạt

Trong các ví dụ, hạt được sử dụng làm cơ chất đại diện cho cơ chất được đề cập trong các bước ii), iv) và v) của các phương pháp theo sáng chế.

Với mục đích của ví dụ này, hạt Toyopearl AF-Amino-650M (Tosoh Bioscience) đã được sử dụng. Hạt được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vì cholesterol 7-keto cholesterol được gắn với hạt cơ bản như được mô tả trong Abdel-Magid AF và cộng sự (Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. J. Org. Chem. 1996:61;3849-3862) bằng cách trộn cholesterol 7-keto (100 mg, 0,25 mmol) và dung dịch Toyopearl (2,5 ml, 0,25 mmol nhóm phản ứng) trong axetonitril (3,5 ml), tiếp theo là xử lý với natri triacetoxyborohydrua (80 mg, 0,375 mmol). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong môi trường N₂ trong 1,5 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm ngừng bằng cách thêm dung dịch NaHCO₃ bão hòa. Các hạt được rửa sạch bằng H₂O, NaCl 1M, và cuối cùng là H₂O để loại bỏ các chất gắn kết dư thừa. Sau đó các nhóm amin dư được axetyl hóa bằng cách thêm 8 ml natri axetat 0,2M và 4 ml anhydrit axetic vào nhựa (resin) ở 0°C trong 30 phút, sau đó thêm 4 ml anhydrit axetic và ủ ở 25°C trong 30 Phút.

Khi axit mycolic, một hỗn hợp các đồng vị tự nhiên của axit mycolic (trọng lượng phân tử 1100-1300) đã được sử dụng để gắn với các hạt theo Law B và Jenner

WN (Immunoassay: A Practical Guide. London: Taylor & Francis. 2005: p 11-31 and Hermanson GT. Bioconjugate Techniques. 3th ed. London; Elsevier. 2013: p 535-545). Tóm tắt như sau: N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC.HCl) (57,7 mg, 0,3 mmol (1,2 equiv.)) và N, N- diisopropylethylamine (DIPEA) (81,3 mg, 0,625 mmol (2,5 equiv.)) đã được bổ sung vào dung dịch amin (Toyopearl amino hoạt tính, 2,5 ml, 0,25 mmol), axit (isolithocholic axit: 93,8 mg, 0,25 mmol (1 equiv)/ axit mycolic: 300 mg, 0,25 mmol (1 equiv)) và HOBt (1-Hydroxybenzotriazole hydrate) (40,5 mg, 0,3 mmol (1,2 equiv.)) Trong DMF (2,5 ml (10ml/1mmol)) và khuấy/lắc trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng trong khí nitơ. Dung môi được loại bỏ bằng phương pháp bay hơi và hạt được rửa bằng cách sử dụng nước và dung dịch NaCl 1M và nước. Các nhóm amino dư (không gắn) được ngăn ngừa phản ứng bằng cách acetyl hóa. Hạt được rửa sạch bằng nước, dung dịch NaCl 1M và nước. Đầu tiên, khí trơ nitơ hoặc argon được tạo ra. Thứ tự chất phản ứng: axit mycolic với DMF (ở 0°C), tiếp theo bổ sung HOBt, bổ sung hạt sau 10 phút, 10 phút sau thêm bazơ DIPEA và cuối cùng, bổ sung EDC sau 15 phút.

Chuẩn bị mẫu

Huyết thanh có nguồn gốc từ người bị bệnh lao được pha loãng 1:5 trong đệm ngăn ngừa phản ứng. Mẫu được sử dụng có nguồn gốc từ cả bệnh nhân dương tính và âm tính. Hai phần 0,5 ml được thu nhận và được chuyển mỗi phần đến một bộ lọc xoay 0,2 µm và được ly tâm ở 10.000 g. Dịch lọc được pha loãng từ 1:5 lên 1:20 trong đệm ngăn ngừa phản ứng.

250 µl dịch lọc được bổ sung vào hạt hoặc được phủ cholesterol, axit mycolic đa vòng hoặc chất ngăn ngừa phản ứng. Hạt được khuấy ở nhiệt độ phòng. Sau khi ủ, hạt được làm lắng nhanh và dịch nổi được sử dụng làm mẫu. Tổng thời gian tiền xử lý mẫu với hạt (theo các bước i)-iv) của phương pháp theo sáng chế trong thiết lập cụ thể này xảy ra dưới 10 phút, sau đó có thể phân tích trực tiếp.

Thủ tục ELISA

Để ngăn ngừa liên kết đặc hiệu của kháng thể với axit mycolic trong các giếng của đĩa ELISA, 300 µl đệm ngăn ngừa phản ứng đã được bổ sung vào mỗi giếng và

được ủ trong 1 giờ. Sau đó, đệm ngăn ngừa phản ứng được thay thế bằng 45 μ l mẫu. Đệm ngăn ngừa phản ứng được sử dụng làm đối chứng âm. Sau khi ủ, đĩa được rửa ba lần bằng PBS. Đệm PBS rửa được thay thế bằng HRP gắn kháng thể thứ cấp trong đệm ngăn ngừa phản ứng. Sau khi ủ, đĩa được rửa lại ba lần bằng PBS. Sau đó, mỗi giếng được bổ sung 50 μ l dung dịch cơ chất TMB-ELISA và đĩa được ủ 15-30 phút ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung vào mỗi giếng 50 μ l axit sulfuric 2M. Độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm đã được đo để định lượng liên kết của các kháng thể với cơ chất axit mycolic của đĩa ELISA.

Xử lý mẫu

Các mẫu được xử lý như sau.

1. Trong nghiên cứu so sánh đầu tiên, hai phần (1 và 2) được lấy từ mỗi một trong 6 mẫu có nguồn gốc từ những người khác nhau. Tất cả các phần được ủ riêng với hạt mà không có tác nhân kết hợp bất kỳ (phần 1 và 2) và lưu trữ cho đến khi thực hiện phương pháp phát hiện ELISA. Tín hiệu ELISA trung bình thu được từ mỗi phần được xác định. Cả hai phần đều có cùng kết quả. Tín hiệu ELISA của hai phần này được đặt ở mức 100%.

2. Trong nghiên cứu so sánh thứ hai, hai phần (3 và 4) đã được lấy từ mỗi một trong số 6 mẫu nói trên. Các mẫu của phần 3 được ủ riêng với hạt kết hợp với tác nhân chặn phản ứng duy nhất và sau đó được lưu trữ cho đến khi thực hiện phương pháp phát hiện ELISA. Các mẫu của phần 4 được ủ riêng với hạt kết hợp với cholesterol và sau đó được lưu trữ cho đến khi thực hiện phương pháp phát hiện ELISA.

3. Trong nghiên cứu so sánh thứ ba, hai phần (5 và 6) được lấy từ mỗi một trong 6 mẫu nêu trên. Các mẫu của phần 5 được ủ riêng với hạt gắn cholesterol và sau đó được lưu giữ cho đến khi thực hiện phương pháp phát hiện ELISA. Các mẫu của phần 6 đầu tiên được ủ riêng với hạt gắn cholesterol, sau đó các mẫu được quay lắt nhanh và dịch nổi được sử dụng cho lần ủ thứ hai với hạt gắn axit mycolic đa vòng. Các mẫu sau đó được lưu trữ cho đến khi thực hiện phương pháp phát hiện ELISA.

4. Trong nghiên cứu tiếp theo, hai phần (7 và 8) được lấy từ mỗi một trong 6 mẫu nêu trên. Cả hai phần 7 và 8 được ủ với hạt gắn cholesterol và các hạt là cơ chất kết hợp với axit mycolic đa dòng đồng thời và sau đó được lưu trữ cho đến khi thực hiện phương pháp phát hiện ELISA.

Ngoại trừ sự khác biệt về hạt, tất cả các điều kiện khác đều giống nhau cho tất cả các phương pháp xử lý.

Kết quả

Tín hiệu ELISA trung bình thu được từ từng phần của 6 mẫu được xác định. Tín hiệu ELISA của các phần 1 và 2 là giống nhau và được đặt ở 100%. Tín hiệu ELISA của các phần khác được thể hiện bằng phần trăm so với tín hiệu của phần 1 (hoặc 2) trên bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Kết quả ELISA

Phần	Tín hiệu ELISA
Phần 1	100%
Phần 2	100%
Phần 3	81%
Phần 4	68%
Phần 5	73%
Phần 6	54%
Phần 7	96%
Phần 8	96%

Các kết quả này chỉ ra rằng các mẫu đầu tiên phơi nhiễm với lipid sterol và tiếp đó phơi nhiễm với cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố

định (các mẫu của phần 6) có tín hiệu ELISA thấp hơn bất kỳ phần nào khác được thử nghiệm. Sự khác biệt rõ ràng có thể được nhận thấy giữa các phần 5 và 6, ở nghiên cứu so sánh có thể được xem là phương án thực hiện mẫu của phương pháp điểm cuối để phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động theo sáng chế. Đáng ngạc nhiên là tín hiệu ELISA thấp thu được từ phần 6 không thể thu được bằng cách ủ mẫu đồng thời với hạt gắn cholesterol và hạt gắn axit mycolic đa dòng. Trong thực tế, tín hiệu ELISA của các phần 7 và 8 thậm chí cao hơn tín hiệu ELISA của hạt chỉ gắn chất ngăn ngừa phản ứng hoặc của hạt gắn cholesterol. Phần được phơi nhiễm với hạt chỉ gắn axit mycolic cũng không thu được kết quả khả quan. Từ kết quả trên cho thấy điều quan trọng là, việc tiền xử lý mẫu xảy ra trong hai bước sau 1) phơi nhiễm với lipit sterol và 2) phơi nhiễm với dẫn xuất axit mycolic để thu được sự giảm tín hiệu rõ ràng nhất và do đó liên kết kháng thể so với mẫu đối chứng không được phơi nhiễm với dẫn xuất axit mycolic.

Hơn nữa, ví dụ cho thấy rằng tổng thời gian tiền xử lý mẫu với hạt (theo các bước i)-v) của phương pháp theo sáng chế) trong thiết lập cụ thể này có thể diễn ra trong thời gian dưới 10 phút, sau đó xét nghiệm có thể được thực hiện.

Thời gian cần thiết để xét nghiệm tùy thuộc vào xét nghiệm phát hiện được sử dụng. Như được đề cập ở trên, thay vì xét nghiệm bằng ELISA, các xét nghiệm phát hiện khác cũng có thể được áp dụng. Mẫu được tiền xử lý như mô tả trên đây, có thể được xét nghiệm bằng cách sử dụng công nghệ thích hợp bất kỳ. Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng khi sử dụng quang phổ tổng trở điện hóa, việc phát hiện liên kết của các kháng thể có trong mẫu với cơ chất phát hiện có thể diễn ra trong vài giây. Điều này cho phép xác định xem một cá nhân có bị nhiễm bệnh lao đang hoạt động hay không một cách nhanh chóng và đáng tin cậy, cho phép phát hiện bệnh lao trong vòng chưa đến 10 phút.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tiền xử lý mẫu từ người hoặc động vật nghi nhiễm lao đang hoạt động, bao gồm các bước:

i) chuẩn bị mẫu từ người hoặc động vật bị nghi ngờ mắc bệnh lao đang hoạt động;

ii) phơi nhiễm mẫu với lipit sterol trong đó lipit sterol được cố định trên cơ chất, trong đó lipit sterol là cholesterol hoặc dẫn xuất của nó, và trong đó lipit sterol loại bỏ kháng thể kháng cholesterol ra khỏi mẫu;

iii) thu ít nhất hai phần của mẫu nói trên hoặc trước khi hoặc sau khi phơi nhiễm mẫu với lipit sterol;

iv) phơi nhiễm phần mẫu đã phơi nhiễm lipit sterol thứ nhất với cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

v) phơi nhiễm phần mẫu đã phơi nhiễm lipit sterol thứ hai với cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; hoặc lưu trữ ít nhất một phần của phần mẫu thứ hai để sử dụng sau, bỏ qua bước phơi nhiễm phần mẫu thứ hai với cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định.

2. Phương pháp theo điểm 1,

trong đó sau khi phơi nhiễm ở bước iv) và bước v) ít nhất một phần của các phần mẫu đã phơi nhiễm được lưu trữ để tiếp tục sử dụng.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic là ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm: axit mycolic, yếu tố thừng, axit mycolic cải biến hóa học, yếu tố thừng cải biến hóa học, dẫn xuất axit mycolic tổng hợp, dẫn xuất yếu tố thừng tổng hợp.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ 1-3, trong đó lipit sterol được cố định lên cơ chất chứa lipit sterol và hợp chất gắn với cholesterol trong mẫu, cụ thể là pectin, amphotericin B hoặc β -cyclodextrin.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ 1-4, trong đó lipit sterol được cố định lên cơ chất bao gồm lipit sterol và phosphatidyl cholin.

6. Hệ thống xách tay dùng để thực hiện phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh lao đang hoạt động, bao gồm:

ít nhất một ống chứa có chứa lipit sterol, trong đó lipit sterol được cố định trên cơ chất, trong đó lipit sterol là cholesterol hoặc dẫn xuất của nó, được bố trí và được cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm lao hoạt tính;

phương tiện để chia dòng mẫu thành ít nhất dòng mẫu thứ nhất và dòng mẫu thứ hai; phương tiện kết nối hoặc ở đầu trên hoặc ở đầu dưới của ống chứa có chứa lipit sterol;

một ống chứa khác tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và nối với đầu dưới của ống chứa có chứa lipit sterol, và chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

một ống chứa khác nữa tiếp nhận dòng mẫu thứ hai, được bố trí song song với ống chứa khác và nối với đầu dưới của ống chứa có chứa lipit sterol; và chứa cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và cơ chất phát hiện thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ nhất từ ống chứa khác nói trên và cơ chất phát hiện thứ hai mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ hai từ ống chứa khác nữa.

7. Hệ thống theo điểm 6, là thiết bị xách tay để thực hiện phương pháp phát hiện dấu hiệu bệnh lao, bao gồm:

bộ cảm biến sinh học (8) bao gồm khoang thứ nhất (9) để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và kết nối với ống chứa thứ hai (6), chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, và khoang thứ hai (10) để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai và kết nối với ống chứa thứ ba (7) và chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định giống như khoang thứ nhất (9).

8. Hệ thống theo điểm 6 hoặc 7, còn bao gồm thêm bộ phận lọc (3) được nối với ống dẫn thứ nhất (2) và ống chứa thứ nhất (4) và được cấu hình để tách huyết tương ra khỏi mẫu máu toàn phần, trong đó bộ phận lọc (3) bao gồm lưới lọc.

9. Hệ thống theo điểm bất kỳ 6-8, bao gồm:

đầu xuyên qua da (1) được nối với ống dẫn thứ nhất (2) được bố trí và cấu hình để nhận mẫu máu từ đầu xuyên qua da (1) và mang mẫu máu đó ra khỏi vùng da;

bộ phận lọc (3) nối với ống dẫn thứ nhất (2) để nhận mẫu máu và được cấu hình để tách huyết tương ra khỏi mẫu máu toàn phần;

ống chứa thứ nhất (4) để tiếp nhận mẫu kể trên, ống chứa thứ nhất (4) có chứa lipit sterol;

phương tiện (5) để chia mẫu thành ít nhất dòng mẫu thứ nhất và dòng mẫu thứ hai;

ống chứa thứ hai (6) để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất, ống chứa thứ hai (6) có chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

ống chứa thứ ba (7) để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai, ống chứa thứ ba (7) có chứa cơ chất không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và

bộ cảm biến sinh học (8) bao gồm khoang thứ nhất (9) để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và kết nối với ống chứa thứ hai (6), chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, và khoang thứ hai (10) để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai và kết nối với ống chứa thứ ba (7) và chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định giống như khoang thứ nhất (9).

10. Hệ thống theo điểm bất kỳ 6-9, trong đó cơ chất của khoang chứa thứ nhất và thứ hai (9, 10) là hợp chất silic, tốt nhất là trong đó cảm biến sinh học bao gồm bộ cộng hưởng vòng Si.

11. Hệ thống để tiền xử lý mẫu từ người và động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động, bao gồm ít nhất một ống chứa có chứa lipit sterol được bố trí và cấu

hình để tiếp nhận dòng mẫu từ người và động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động; các phương tiện để chia dòng mẫu thành ít nhất một dòng mẫu thứ nhất và một dòng mẫu thứ hai; các phương tiện này hoặc được kết nối hoặc ở phía trước hoặc ở phía sau của ít nhất một ống chứa có chứa lipit sterol; ống chứa thứ hai để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất được kết nối ở phía sau của ống chứa có chứa lipit sterol, và có chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; ống chứa thứ ba để tiếp nhận dòng mẫu thứ hai được bố trí song song với ống chứa thứ hai và được kết nối ở phía sau ống chứa thứ nhất có chứa lipit sterol; và bao gồm cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định, và các phương tiện lưu trữ hoặc chuyển mẫu đã xử lý.

12. Hệ thống để tiền xử lý dòng mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động, hệ thống bao gồm các phương tiện để phân chia dòng mẫu thành ít nhất một dòng mẫu thứ nhất và một dòng mẫu thứ hai; ít nhất một cột thứ nhất và một cột thứ hai, được cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và dòng mẫu thứ hai tương ứng; cột thứ nhất bao gồm một ngăn chứa lipit sterol và ngăn còn lại chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định nằm ở phía dưới của ngăn chứa lipit sterol; và cột thứ hai bao gồm một ngăn chứa lipit sterol và ngăn còn lại chứa cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định nằm ở phía dưới của ngăn chứa lipit sterol; và các phương tiện để lưu trữ hoặc chuyển các mẫu đã xử lý đi qua các cột nói trên.

13. Hệ thống để tiền xử lý dòng mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động, hệ thống bao gồm các phương tiện để phân chia dòng mẫu thành ít nhất một dòng mẫu thứ nhất và một dòng mẫu thứ hai; ít nhất một cột thứ nhất và một cột thứ hai, được cấu hình để tiếp nhận dòng mẫu thứ nhất và dòng mẫu thứ hai tương ứng; cột thứ nhất bao gồm một ngăn chứa lipit sterol và ngăn còn lại chứa cơ chất thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định nằm ở phía dưới của ngăn chứa lipit sterol; và cột thứ hai bao gồm một ngăn chứa lipit sterol và ngăn còn lại chứa cơ chất thứ hai không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định nằm ở phía dưới của ngăn chứa lipit sterol; và cơ chất phát hiện thứ nhất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được

cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ nhất và cơ chất thứ hai mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định để tiếp nhận ít nhất một phần của dòng mẫu thứ hai.

14. Hệ thống theo điểm 12 hoặc 13, trong đó lipit sterol được cố định trên các hạt, và cơ chất thứ nhất và cơ chất thứ hai là các hạt.

15. Hệ thống theo điểm bất kỳ 6, 13-14, trong đó các cơ chất phát hiện thứ nhất và thứ hai là màng microporous, tốt nhất là màng nitroxenluloza.

16. Hệ thống theo điểm 6, 13-15, trong đó cơ chất phát hiện thứ nhất và cơ chất phát hiện thứ hai được hình thành bởi các điểm tách biệt trên cùng một cơ chất.

17. Hệ thống theo điểm bất kỳ 6-16, trong đó lipit sterol được cố định trên cơ chất bao gồm lipit sterol và hợp chất liên kết với cholesterol trong mẫu, cụ thể là pectin, amphoterixin B hoặc β -cyclodextrin.

18. Bộ dụng cụ (kit) dùng để chẩn đoán bệnh lao hoặc tiền xử lý mẫu cho chẩn đoán bệnh lao, bao gồm:

một hoặc nhiều phương tiện xuyên qua da;

một hoặc nhiều ống nối;

một hoặc nhiều ống chứa được phủ lipit sterol và chất bất kỳ bao gồm photphatidyl cholin, pectin, amphoterixin B hoặc β -cyclodextrin;

một hoặc nhiều ống chứa có chứa cơ chất mang hoặc không mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định;

một hoặc nhiều ống chứa để chuyển và lưu trữ mẫu và/hoặc ít nhất một màng microporous với kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định trên đó, và tùy chọn các kháng thể thứ cấp liên kết với chuỗi nặng của các kháng thể kháng lại kháng nguyên có nguồn gốc mycolic có trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động; hoặc một hoặc nhiều bộ cảm biến sinh

học bao gồm ít nhất hai khoang có chứa cơ chất mang kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định; và

tùy chọn các phương tiện để pha loãng máu hoặc huyết tương và/hoặc bộ phận lọc.

19. Bộ dụng cụ (kit) dùng để chẩn đoán bệnh lao hoặc tiền xử lý mẫu cho chẩn đoán bệnh lao, bao gồm:

một hoặc nhiều phương tiện xuyên qua da;

một hoặc nhiều ống nối;

một hoặc nhiều cột, bao gồm một ngăn có chứa cơ chất được phủ lipid sterol và chất bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm phosphatidyl cholin, pectin, amphotericin B và β -cyclodextrin; và một ngăn có chứa cơ chất được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định ở bên dưới ngăn có chứa cơ chất được phủ lipid sterol nói trên;

một hoặc nhiều cột, bao gồm một ngăn có chứa cơ chất được phủ lipid sterol và chất bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm phosphatidyl cholin, pectin, amphotericin B và β -cyclodextrin; và một ngăn có chứa cơ chất không được phủ kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định ở bên dưới ngăn có chứa cơ chất được phủ lipid sterol nói trên;

tùy chọn một hoặc nhiều ống chứa để chuyển và lưu trữ mẫu;

tùy chọn phương tiện để pha loãng máu hoặc huyết tương và/hoặc bộ phận lọc;

tùy chọn ít nhất một màng microporous với kháng nguyên có nguồn gốc axit mycolic được cố định trên đó; và

tùy chọn các kháng thể thứ cấp liên kết với chuỗi nặng của các kháng thể kháng lại kháng nguyên có nguồn gốc mycolic có trong mẫu có nguồn gốc từ người hoặc động vật nghi ngờ nhiễm bệnh lao đang hoạt động.

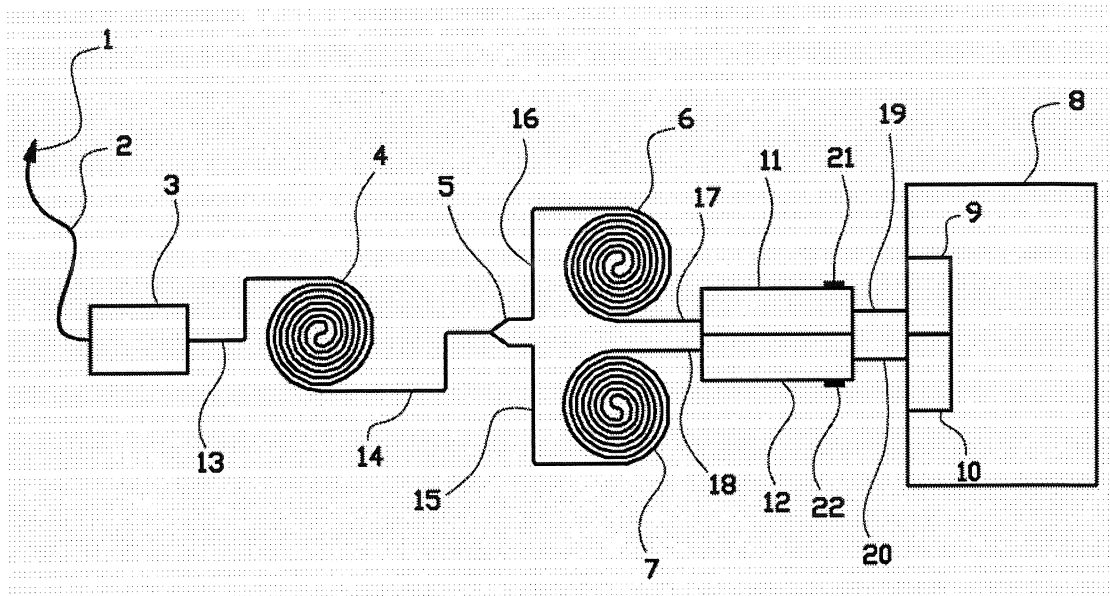


Fig.1

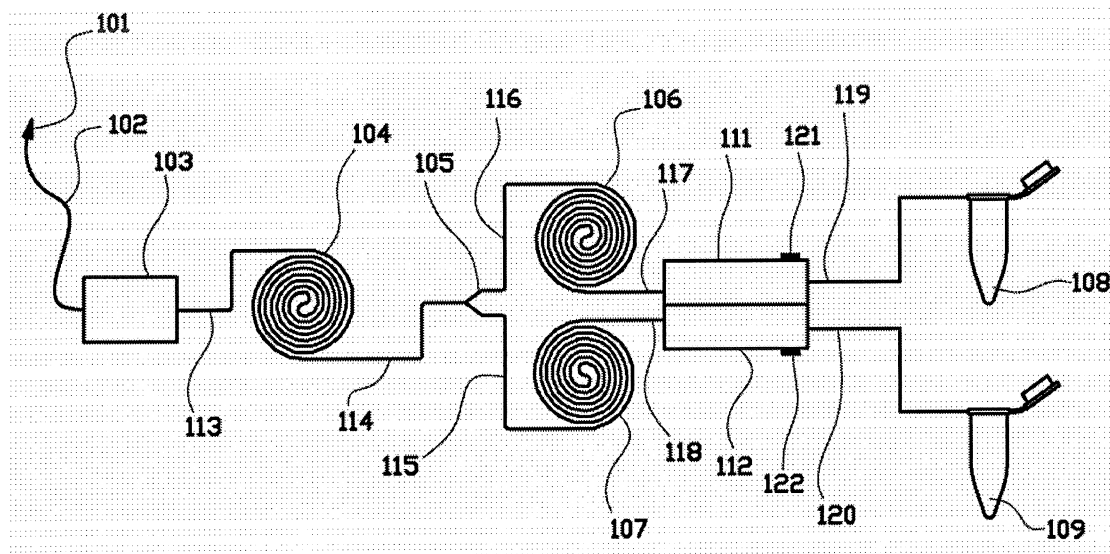


Fig.2