



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

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

(11) 
1-0021008

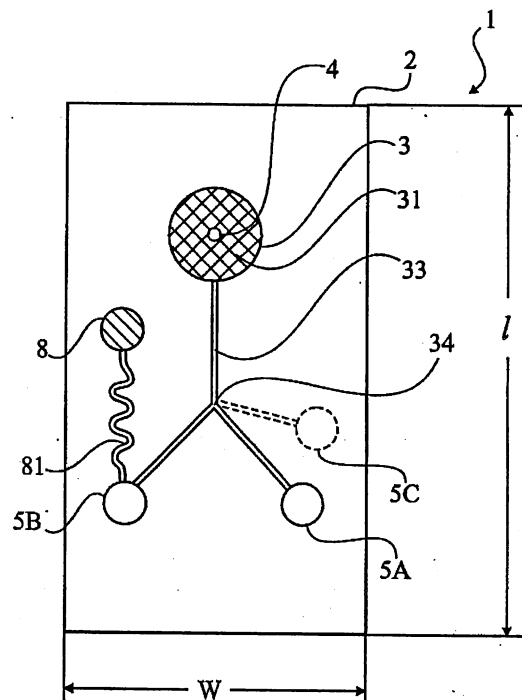
(51)⁷ C12Q 1/32, A61B 10/00, 5/15, G01N
33/543, 33/573, 33/72

(13) B

- (21) 1-2012-00754 (22) 30.09.2010
(86) PCT/SE2010/051048 30.09.2010 (87) WO2011/040874 07.04.2011
(30) 0950717-9 30.09.2009 SE
61/247,214 30.09.2009 US
61/304,612 15.02.2010 US
(45) 27.05.2019 374 (43) 25.07.2012 292
(73) CALMARK SWEDEN AKTIEBOLAG (SE)
c/o Mathias Karlsson Ekasvagen 2 S-653 42 Karlstad, Sweden
(72) KARLSSON Mathias (SE), HIORT AF ORNAS Sofia (SE)
(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) HỆ THỐNG THỬ NGHIỆM DÙNG ĐỂ ĐÁNH GIÁ SỰ TỔN THƯƠNG TẾ BÀO DO TÌNH TRẠNG THIẾU OXY GÂY RA

(57) Sáng chế đề cập tới hệ thống thử nghiệm dùng để đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra ở động vật có vú kể cả người, bao gồm dụng cụ dùng một lần có cửa nạp mẫu và buồng gom được phân cách bởi bộ phận tách trong đó buồng gom được nối với ít nhất hai khoang phát hiện trực quan thứ nhất và thứ hai, trong đó ít nhất một khoang được bố trí cùng với thuốc thử hoá học để phát hiện trực quan trực tiếp, khoang phát hiện thứ nhất này được bố trí để xác định xem liệu rằng lượng hemoglobin (Hb) có trong mẫu dịch thể lấy của động vật có vú nêu trên có vượt quá trị số ngưỡng định trước hay không, và khoang phát hiện thứ hai được bố trí để đánh giá tổng lượng lactat dehydrogenaza (LDH) có trong mẫu này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới hệ thống thử nghiệm dùng để đánh giá sự tổn thương tế bào, ví dụ, gây ra bởi chứng đói oxy cục bộ ở động vật có vú kể cả người bao gồm dụng cụ dùng một lần có bộ phận gom mẫu cùng với bộ phận tách huyết tương.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc đánh giá tình trạng thiếu oxy (sự thiếu hụt oxy) ở động vật có vú có thể được thực hiện bằng cách xác định tổng lượng lactat dehydrogenaza (LDH) nằm trong dịch thể được tạo ra từ mẫu đã được gom. Việc xác định tổng lượng LDH kết hợp với các chất đánh dấu tiên lượng bổ sung aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT) và lactat được dùng để cho phép đánh giá tình trạng của động vật có vú liên quan tới sự thiếu hụt oxy hoàn toàn hoặc một phần, thông tin mà nhờ đó có thể đưa ra các quyết định về các can thiệp y học khác. Có nhiều ví dụ về các tình huống y học mà việc phát hiện tình trạng thiếu oxy có thể là điều mong muốn, và bao gồm việc theo dõi trong khi sinh hoặc sau khi sinh nở, phân tầng nguy cơ, phẫu thuật, cấy ghép cơ quan hoặc các quá trình y học khác hoặc các điều trị phẫu thuật. Điều hiển nhiên mong muốn là việc phát hiện bằng (các) chất đánh dấu sinh học nêu trên được thực hiện một cách nhanh chóng để sao cho các can thiệp thích hợp được đưa ra càng nhanh càng tốt để có thể tránh được các tổn thương lâu dài do tình trạng thiếu oxy gây ra.

Một phương pháp xác định tình trạng thiếu oxy đã được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ No. 12/101,470, trong đó tổng lượng LDH trong huyết tương của người bệnh được xác định, có thể là kết hợp với một trong số K, Mg, Ca, AST, ALT và lactat, và trong đó các lượng lớn của một hoặc nhiều chất đánh dấu sinh học này là một chỉ báo về tình trạng thiếu oxy ở người bệnh. Cũng được mô tả là việc sử dụng bộ phận tách huyết tương kết hợp với thiết bị định lượng và/hoặc định tính nhanh các chất đánh dấu sinh học nêu trên. Một cách để xác định các chất đánh dấu tiên lượng theo đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/101,470 là cách phát hiện trực quan, được bố trí cùng với các phương tiện hoá học khô.

Hiện có nhiều cách khác nhau để xác định lượng LDH, phần lớn trong số đó là dựa trên việc phát hiện trực quan sự diễn ra các phản ứng hoá học giữa các thuốc thử và các chất sinh màu. Patent Mỹ 4056485 đề cập tới việc ứng dụng trong việc xác định các enzym nhất định gây ra sự khử 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoli clorua (INT) không màu thành 1-(p-iodophenyl)-5-(p-nitrophenyl)-3-phenylformazan (INT formazan) màu đỏ tươi. Dung dịch chuẩn tham chiếu đã được nhuộm màu trong nước đã được đề xuất trong patent Mỹ 4056485 có độ hấp thụ tối đa ở 500 nanomet và là thích hợp để sử dụng trong việc xác định, ví dụ, lactat dehydrogenaza (LDH), creatin phosphokinaza, glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, adenosin phosphat, glucoza, glucoza-6-phosphat, 6-phosphogluconat và các chất tương tự trong huyết thanh.

Vấn đề chính liên quan đến các phương pháp hiện thời dùng để xác định các chất đánh dấu sinh học đó là thường phải đưa chúng tới phòng thí nghiệm trung tâm có khả năng xác định chất đánh dấu đáng được quan tâm, tức là thời gian để nhận các kết quả xét nghiệm trong số trường hợp trở nên kéo dài không mong muốn. Ở nhiều nơi không sẵn có phòng xét nghiệm trung tâm, và việc thiết lập nó sẽ đòi hỏi các phi phí lớn.

Một phương án khác dùng cho phòng xét nghiệm trung tâm là thiết bị đo loại nhỏ, ví dụ, bằng cách sử dụng băng mẫu thử và dụng cụ đo như dụng cụ thử vết loại nhỏ hoặc quang phổ kế cầm tay. Các loại thiết bị như vậy thường là đắt tiền và thường đòi hỏi một chuyên môn nhất định của người vận hành về cả vấn đề điều khiển lẫn việc thể hiện các kết quả đọc từ thiết bị. Nhìn ở góc độ toàn cầu, nhiều quốc gia chưa có những hệ thống điều trị y tế tiên tiến và có chức năng thích hợp, và các giải pháp công nghệ cao không được áp dụng do thiếu nguồn lực kinh tế, hoặc đơn giản là chỉ vì thiếu các bác sĩ hoặc các nhà cung cấp dịch vụ chăm sóc y tế có khả năng thực hiện các xét nghiệm như vậy.

Ngay cả trong trường hợp có một hệ thống chăm sóc y tế phát triển thì các tình huống dẫn đến thời gian kéo dài và/hoặc các thiết bị xét nghiệm phức tạp là điều không mong muốn, đặc biệt khi thời gian là một yếu tố cấp bách và chỉ cần có chỉ báo về tình trạng y tế học là đủ để thực hiện việc điều trị bệnh thích hợp cho người bệnh.

Vì có vấn đề nêu trên, có nhu cầu về các phương pháp xét nghiệm chăm sóc y tế có khả năng áp dụng trong nhiều tình huống y học khác nhau, khi yếu tố thời gian là quan trọng và việc đánh giá nhanh chóng tình trạng bệnh nhân là có giá trị đối với việc điều trị y tế tiếp theo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích chủ yếu của sáng chế là đề xuất cách mới để đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra trong các tình huống y học khác nhau gây ra, cách mới như vậy bao gồm việc đưa ra một thử nghiệm nhanh và thân thiện đối với người sử dụng, tốt hơn là một thử nghiệm tại giường, có quy mô nhỏ, tốt hơn là không phụ thuộc vào dụng cụ bất kỳ và đề xuất một cách phát hiện gần như tức thời các lượng lớn của các chất đánh dấu sinh học được chọn chỉ báo tình trạng thiếu oxy ở động vật có vú.

Các mục đích khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn thông qua phần mô tả dưới đây và Yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Mục đích của sáng chế đạt được nhờ hệ thống thử nghiệm dùng để đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra ở động vật có vú kể cả người, bao gồm dụng cụ dùng một lần có chứa nạp mẫu và buồng gom được bố trí cùng với bộ phận tách trong đó buồng gom này được nối với ít nhất hai khoang phát hiện trực quan (thứ nhất và thứ hai), trong đó ít nhất một khoang được bố trí cùng với thuốc thử hoá học để phát hiện trực tiếp, khoang phát hiện thứ nhất này được bố trí để xác định xem lượng hemoglobin (Hb) có trong mẫu dịch thể lấy từ động vật có vú nêu trên có vượt quá một lượng định trước hay không, và khoang phát hiện thứ hai được bố trí để đánh giá tổng lượng lactat dehydrogenaza (LDH) có trong mẫu này nhờ thuốc thử hoá học.

Mục đích của sáng chế cũng đạt được nhờ phương pháp đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra ở động vật có vú, phương pháp này bao gồm các bước cung cấp mẫu dịch thể của động vật có vú bao gồm các hạt như các tế bào máu, và sau đó tách các hạt này ra khỏi mẫu dịch thể bằng bộ phận tách, cho dịch thể đã được tách này tiếp xúc với thuốc thử hoá học để phát hiện trực tiếp, và xác định xem lượng Hb có trong dịch thể này lớn hơn hay nhỏ hơn hơn trị số ngưỡng định trước.

Nếu lượng Hb nhỏ hơn trị số ngưỡng thì tổng lượng lactat dehydrogenaza (LDH) trong dịch thể được đánh giá, và có nguy cơ và/hoặc sự có mặt của sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra từ việc đánh giá mức LDH có trong dịch thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "LDH" được dùng để chỉ tổng lượng lactat dehydrogenaza, mà không kể tới các isoenzym của chúng.

Mặc dù mẫu dịch thể có thể là mẫu máu nguyên vẹn, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, dịch não tủy (CSF), dịch ổ bụng, hoặc nước bọt, song các ví dụ được đưa ra dưới đây chủ yếu liên quan tới việc xét nghiệm các mẫu máu. Cần phải hiểu rằng thuật ngữ "mẫu máu" có thể hiểu là bao gồm các dạng khác của dịch thể như nêu trên.

Bằng cách cung cấp mẫu máu với lượng cỡ micro lít và phân tích trực quan đối với các chất đánh dấu sinh học tiên lượng được chọn theo sáng chế, hệ thống thử nghiệm được đề xuất là nhanh chóng, dễ sử dụng, dễ hiểu, và nó có thể được cung cấp dưới dạng bộ dụng cụ đo dùng một lần tiêu chuẩn, kích thước nhỏ cho các kỹ thuật viên y tế là những người có thể sử dụng chúng ngay tức thì để điều trị bệnh cho người bệnh, bất kể tình huống điều trị bệnh là phẫu thuật, phân tầng nguy cơ hoặc theo dõi.

Thuật ngữ "tình trạng thiếu oxy" được dùng để chỉ sự thiếu hụt oxy hoàn toàn hoặc một phần có thể bị gây ra bởi chứng thiếu máu cục bộ hoặc sự oxy hóa không đầy đủ hoặc thiếu máu cấp. Tình trạng thiếu oxy có thể hoặc không thể dẫn đến tổn thương vật lý, và phản ứng toàn thân với tình trạng thiếu oxy là khác nhau tùy thuộc vào người bệnh. Ví dụ, ở thai nhi bị tình trạng thiếu oxy trong khi sinh hoặc gần khi sinh, dòng máu trong cơ thể nó sẽ được phân bố lại từ các cơ quan "ít quan trọng hơn" cho các cơ quan được ưu tiên gồm não, tim và tuyến thượng thận. Mặt khác, người trưởng thành có thể không chịu được mức độ tình trạng thiếu oxy như vậy mà không có tổn thương. Tình trạng thiếu oxy đủ trầm trọng để làm tổn thương các tế bào sẽ dẫn đến việc khiến cho các enzym thoát ra đi vào vòng tuần hoàn, và hậu quả là các tế bào sẽ chết khi lượng enzym trong máu gia tăng hơn nữa. Các enzym và các chất đánh dấu tiên lượng có thể được sử dụng để đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra gồm LDH, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), lactat, creatin kinaza

(CK), K, Mg và Ca. Trong bản mô tả này thuật ngữ "tình trạng thiếu oxy" được dùng để chỉ sự thiếu hụt oxy đủ nghiêm trọng để tạo ra sự tổn thương tế bào.

Theo một phương án của sáng chế, việc đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra ở động vật có vú được thực hiện bằng cách đầu tiên chuẩn bị mẫu máu của động vật có vú, kể cả người, và cấp mẫu máu này vào cửa nạp mẫu của hệ thống thử nghiệm để tách các tế bào máu đỏ ra khỏi huyết tương nhờ bộ phận tách huyết tương. Tiếp theo, áp suất âm bên trong dụng cụ dùng một lần được tạo ra để chuyển huyết tương qua bộ phận tách huyết tương và đi tiếp vào ít nhất là các khoang phát hiện thứ nhất và thứ hai ở đó huyết tương tiếp xúc với các thuốc thử nằm trong đó. Mỗi khoang phát hiện có một thành phần thuốc thử đặc thù với chất đánh dấu cần được phát hiện (ví dụ, Hb, LDH). Phản ứng hoá học giữa chất đánh dấu trong huyết tương và thành phần thuốc thử (tức là, thuốc thử hoá học) nằm trong một khoang phát hiện gây ra sự dịch màu nhìn thấy được, tức là phép phân tích so màu có thể thực hiện được. Ví dụ, trong trường hợp Hb có thể có sự thay đổi về màu sắc khi lượng Hb trong mẫu vượt quá một mức đã định trước nhất định, nếu không thì sẽ không xảy ra sự dịch màu. Tốt hơn là, trong trường hợp LDH, khi lượng chất đánh dấu dưới một mức đã được định trước, sẽ không xảy ra sự dịch màu trong khoang phát hiện tương ứng. Nếu lượng chất đánh dấu lớn hơn một mức đã được định trước sự dịch màu tốt hơn là sẽ xảy ra, nhưng không nhất thiết, tỷ lệ với lượng chất đánh dấu có mặt trong huyết tương được thử nghiệm. Tốt hơn, nếu mỗi khoang phát hiện là thấy được, tức là kỹ thuật viên hoặc người chăm sóc sức khỏe sẽ nhìn thấy được nếu như có một phản ứng xảy ra trong đó và nhờ vậy có thể phát hiện trực quan sự có mặt của Hb và LDH một cách tương ứng trong huyết tương. Sự có mặt của Hb ở trên một mức đã được định trước trong mẫu là một chỉ báo về sự tan huyết và do hồng cầu chứa LDH lên tới 150 lần so với sự tan huyết trong huyết thanh là một nguyên nhân gây lỗi. Do vậy, trong trường hợp sự có mặt của Hb là cao hơn một mức đã được định trước nêu trên thì xét nghiệm này cần được làm lại. Nếu sự tan huyết không xảy ra thì sự có mặt của sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra được đánh giá từ việc phát hiện đo màu trực quan đối với LDH có trong huyết tương.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sự dịch màu do sự có mặt của một chất đánh dấu ở trên một mức đã được định trước có thể được thể hiện bằng cách so

sánh với một bảng màu hoặc khoảng tham chiếu đã chuẩn hóa, được hiệu chuẩn để đọc định lượng chất đánh dấu. Ví dụ, lượng LDH trong một mẫu có thể được chỉ định theo một khoảng tham chiếu đã chuẩn hóa dưới dạng thang độ thể hiện sự gia tăng độ đậm màu, trong đó các màu sắc cường độ thấp (ví dụ, màu tím nhạt) tương ứng với các nồng độ thấp của LDH và các màu sắc cường độ cao (ví dụ, màu tím sẫm) tương ứng với các nồng độ cao của LDH. Theo tình trạng kỹ thuật của sáng chế màu sắc sau phản ứng giữa chất đánh dấu và thành phần thuốc thử được so sánh với hệ tham chiếu tiêu chuẩn nhờ vậy hàm lượng chất đánh dấu trong một mẫu có thể được đánh giá.

Tất nhiên là có thể tạo ra một khoảng tham chiếu đã chuẩn hóa thể hiện cho các màu sắc khác nhau, trong đó, ví dụ, màu đỏ thể hiện cho nồng độ thấp của chất đánh dấu và màu tím thể hiện cho các nồng độ cao hơn.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, khoảng tham chiếu đã chuẩn hóa được chia thành một số phân đoạn màu sắc giới hạn, mỗi phân đoạn thể hiện cho một độ đậm màu tương ứng với một khoảng nhất định của chất đánh dấu. Theo cách này, hệ tham chiếu theo kiểu bậc để đánh giá lượng chất đánh dấu là đạt được, nó có thể hữu ích trong các trường hợp khi mà thông tin chi tiết hơn về lượng chất đánh dấu là được mong muốn.

Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là việc xác định lượng Hb bằng thành phần thuốc thử, khi được tiếp xúc với mẫu, màu sắc thay đổi dần dần, tuy nhiên độ đậm màu tương ứng với một trị số ngưỡng đã đặt sẵn của Hb được xác định một cách rõ ràng để đảm bảo rằng các kết quả xét nghiệm được thể hiện một cách chính xác.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, khoang phát hiện được dự liệu cho việc đánh giá sự tan huyết không phụ thuộc thuốc thử hoá học hoặc các thuốc thử bất kỳ. Việc đánh giá sự tan huyết thay vì chỉ đạt được bởi việc quan sát trực quan mẫu đã được lọc, tốt hơn là huyết tương, thì nó được thể hiện trong khoang phát hiện, và trên cơ sở màu sắc (hoặc độ màu) của huyết tương xác định sự tan huyết có xảy ra hay không. Nói chung, khi huyết tương trong suốt, không có sự tan huyết xảy ra, nhưng khi huyết tương có màu hồng hoặc hồng sẫm thì sự tan huyết có thể là đã xảy ra và phân tích cần được làm lại. Để tạo thuận lợi cho việc đánh giá sự tan huyết, hệ thống thử nghiệm có thể có một biểu đồ màu tham chiếu

để dùng cho việc so sánh với màu sắc của huyết tương, bao gồm sắc thái hồng chỉ báo sự tan huyết đã xảy ra một cách rõ ràng sát với khoang phát hiện tương ứng. Cần hiểu rằng một biểu đồ màu tham chiếu như vậy có thể được tích hợp cùng với dụng cụ dùng một lần nhưng nó cũng có thể được tạo ra dưới dạng một bộ phận dùng vĩnh viễn của hệ thống thử nghiệm được phân phối cùng với dụng cụ dùng một lần.

Trong hầu hết các dạng không phức tạp của nó, hệ thống thử nghiệm theo sáng chế có thể chỉ bao gồm tham chiếu dương tính-âm tính. Theo một phương án như vậy, một mức đã được định trước được thiết lập cho mỗi chất đánh dấu, và thành phần thuốc thử trong mỗi khoang phát hiện được bố trí để làm thay đổi/biến đổi màu sắc với mức đã được định trước nêu trên để sao cho kỹ thuật viên y tế sẽ biết một cách đơn giản việc lượng chất đánh dấu được chọn là ở dưới hoặc bằng/ở trên một mức đã đặt sẵn. Có thể có lợi, nếu hệ thống thử nghiệm như vậy đủ khả năng để biểu thị cho nguy cơ sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, các khoang phát hiện được bố trí cùng với thuốc thử hoá học dưới dạng thuốc thử hoá học khô hoặc thuốc thử hoá học ướt. Theo một khía cạnh của sáng chế, mỗi khoang phát hiện được bố trí cùng với thuốc thử hoá học cho một chất đánh dấu tiên lượng nhất định, như LDH và Hb. Mỗi khoang phát hiện được bố trí một thành phần thuốc thử để phản ứng với một chất đánh dấu như vậy. Thành phần thuốc thử có thể là thuốc thử hoá học khô hoặc thuốc thử hoá học ướt tùy thuộc vào thiết kế của hệ thống thử nghiệm cụ thể.

Theo một khía cạnh của sáng chế, thành phần thuốc thử để phát hiện LDH có thể chứa thuốc thử dưới dạng hợp chất tetrazoli, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm nitro tetrazoli xanh (NBT), 1-(p-jodo-fenyl)-5-(p-nitro-fenyl)-3-fenylformazan (INT) và 3-(4, 5-đimetylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxyphe-nyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli (MTS), tất cả chúng đều đã biết là chất để dùng cho các hệ thống thử nghiệm đo màu. Tốt hơn là, thành phần thuốc thử cũng bao gồm chất trung gian dưới dạng phenazin metosulphat (PMS) hoặc 1-metoxi-5-metylphenazini metylsulphat (mPMS) cũng như và lactat và NAD. Theo một ví dụ, thành phần thuốc thử để phát hiện LDH bao gồm hợp chất tetrazoli (NBT) trong chất đệm bao gồm N-metyl-D-gluxamin. Tốt hơn là, độ pH bên trong các khoang

phát hiện là nằm trong khoảng từ 8 đến 11, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 9 đến 10,5 để tối ưu các điều kiện cho phản ứng enzym tối ưu xảy ra. Các thành phần thuốc thử cho LDH được minh họa tiếp trong các Ví dụ từ 1 đến 4.

Theo một khía cạnh của sáng chế, thành phần thuốc thử để phát hiện Hb có thể chứa thuốc thử dưới dạng hợp chất benziđin, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm tetrametylbenziđin (TMB) và 3,3'-điaminobenziđin (DAB). Thành phần thuốc thử cho Hb có thể còn bao gồm chất nền peroxit, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm hydro peroxit, và tert-butylhydroperoxid (T-hydro). Tốt hơn nếu độ pH bên trong khoang phát hiện 5A cho Hb là nằm trong khoảng từ 3 đến 7, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5. Các thành phần thuốc thử cho Hb được minh họa tiếp trong các Ví dụ 5 và 6.

Theo một khía cạnh của sáng chế, thuốc thử hoá học ướt được đặt trong dụng cụ dùng một lần bên trong các bộ phận lưu giữ cho các thuốc thử ướt, ví dụ, trong các giếng phản ứng hoặc trong các bộ phận bao gói kiểu phồng. Theo một khía cạnh, các bộ phận bao gói kiểu phồng này được thiết kế để vỡ hoặc bị làm vỡ khi bắt đầu sử dụng hệ thống thử nghiệm, ví dụ, bằng cách làm vỡ bằng tay trước hoặc sau khi nạp mẫu vào dụng cụ dùng một lần. Việc làm vỡ bằng tay, ví dụ, có thể được thực hiện bằng cách người sử dụng ấn lên bề mặt của dụng cụ dùng một lần ở vị trí dẫn đến sự ép lên bao gói kiểu phồng và làm vỡ nó. Sự vỡ của bao gói kiểu phồng làm cho thuốc thử hoá học được giải phóng và có thể được tiếp xúc với mẫu được xét nghiệm. Nhờ điều này, phản ứng giữa các thành phần hóa học thuốc thử và các chất đánh dấu có thể có trong mẫu có thể được xúc tiến.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, dụng cụ dùng một lần có nhiều hơn hai khoang phát hiện được bố trí trên thẻ, tốt hơn là mỗi khoang nêu trên được bố trí cùng với thuốc thử hoá học dưới dạng một thành phần thuốc thử. Tốt hơn là, có nhiều hơn hai khoang phát hiện mà mỗi khoang chứa thuốc thử hoá học để phát hiện trực quan trực tiếp cho một thành phần của nhóm gồm các chất đánh dấu tiên lượng sau đây: Hb, LDH, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), lactat, creatin kinaza (CK), K, Mg và Ca. Tốt hơn là, mỗi dụng cụ này bao gồm hai khoang phát hiện lần lượt để phát hiện Hb và LDH, và

tùy ý một hoặc nhiều khoang phát hiện để phát hiện cho một hoặc nhiều trong số AST, ALT, lactat, CK, K, Mg và Ca.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, hệ thống thử nghiệm bao gồm phương tiện để tạo ra áp suất âm bên trong dụng cụ dùng một lần để đẩy huyết tương từ mẫu máu đi vào qua bộ phận tách nêu trên và đi vào ít nhất hai khoang phát hiện.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hệ thống thử nghiệm và phương pháp theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn ở dưới đây có viện dẫn tới các hình vẽ kèm theo. Phần mô tả dưới đây sẽ chỉ được xem là các phương án được tiên, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Fig.1A là sơ đồ khối của hệ thống thử nghiệm theo một ví dụ của sáng chế, Fig.1B là mặt cắt của hệ thống thử nghiệm trên Fig.1A,

Fig.1C là sơ đồ khối của hệ thống thử nghiệm bao gồm cơ cấu tạo áp suất âm,

Fig.2A-B là hệ thống thử nghiệm theo một ví dụ khác của sáng chế,

Fig.3 là hệ thống thử nghiệm theo một ví dụ khác nữa của sáng chế,

Fig.4A là hình vẽ phối cảnh của hệ thống thử nghiệm theo một phương án của sáng chế, có bộ gom mẫu mao quản tách biệt, và

Fig.4B là hình vẽ phối cảnh của hệ thống thử nghiệm bao gồm bộ gom mẫu mao quản được tích hợp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phần mô tả chi tiết dưới đây, sự viện dẫn sẽ được đưa ra đối với các hình vẽ minh họa cho các phương án khác nhau của hệ thống thử nghiệm 1 theo sáng chế. Tuy nhiên, cần hiểu rằng sáng chế cũng đề cập tới phương pháp để đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra ở động vật có vú, và nhiều dấu hiệu đã mô tả liên quan tới hệ thống thử nghiệm 1 này cũng có thể áp dụng được cho phương pháp tương ứng.

Trên các Fig.1A và Fig.B thể hiện hệ thống thử nghiệm 1 theo một phương án của sáng chế bao gồm dụng cụ dùng một lần 2, tốt hơn là được bố trí cùng với

nhiều khoang phát hiện khác nhau 5A-C sẽ được giải thích một cách chi tiết hơn ở dưới. Trên Fig.1A minh họa dưới dạng sơ đồ hình chiếu nhìn từ trên xuống của hệ thống thử nghiệm 1 bao gồm thân dạng dẹt ở đây là dưới dạng hộp chứa 2 có bộ phận gom mẫu có cửa nạp mẫu 4 để tiếp nhận mẫu dịch thể 9, ví dụ, máu nguyên vẹn, đã lấy từ động vật có vú. Như được họa dưới dạng sơ đồ trên Fig.1B, dụng cụ hộp chứa dùng một lần 2 có khoang tiếp nhận 6 đã được làm thích ứng để lắp vào bộ gom mẫu mao quản 7 cấp mẫu dịch thể 9 đã lấy từ động vật có vú. Liên quan tới khoang tiếp nhận 6, ở đáy của nó, có một bề mặt chung mà theo cách đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này ngăn sự dịch chuyển tiếp của mẫu dịch thể vào bộ phận tách 3, bộ phận tách này bao gồm bộ lọc 31 và buồng gom 32. Bộ lọc 31 trên Fig.1A có dạng tròn, và có diện tích nằm trong khoảng từ 3mm^2 đến 500mm^2 , tốt hơn là nhỏ hơn 150mm^2 . Cần hiểu rằng diện tích thích hợp của bộ lọc 31 là phụ thuộc vào thể tích mẫu được mong muốn, và diện tích của bộ lọc 31 do đó có thể điều chỉnh được một cách phù hợp. Buồng gom 32 được nối, tốt hơn là qua kênh vi dẫn 33, vào ít nhất hai khoang phát hiện trực quan thứ nhất 5A và khoang phát hiện trực quan thứ hai 5B, trong đó ít nhất là một, nhưng cũng có thể là cả hai khoang này được bố trí cùng với thuốc thử hoá học để phát hiện trực tiếp, tốt hơn là phát hiện trực quan trực tiếp ít nhất là một chất đánh dấu sinh học tiên lượng LDH. Khoang phát hiện 5A được bố trí để xác định mức hoặc lượng hemoglobin (Hb) trong mẫu 9' có thể có hoặc không có thuốc thử hoá học. Sự tan huyết có thể được đánh giá bằng cách quan sát độ màu của huyết tương đi vào khoang tương ứng, trong trường hợp này thuốc thử hoá học có thể là không cần thiết. Tuy nhiên, cũng có thể phát hiện Hb bằng thuốc thử hoá học. Nằm giữa buồng gom huyết tương 32 và các khoang phát hiện 5A-C, kênh vi dẫn 33 có thể được bố trí cùng với bộ phận chia mẫu 34 để dẫn hướng huyết tương 9' đi vào từng khoang trong số các khoang phát hiện 5A-C khác nhau.

Theo một ví dụ, khoang phát hiện thứ nhất 5A được bố trí để xác định liệu rằng mức hemoglobin (Hb) trong mẫu dịch thể có vượt quá một lượng định trước hay không (trị số ngưỡng), và khoang phát hiện thứ hai 5B được bố trí để đánh giá tổng lượng lactatdehydrogenaza (LDH) trong mẫu. Như được chỉ ra bằng các đường nét đứt trên Fig.1A, dụng cụ dùng một lần 2 có thể có nhiều hơn hai khoang phát hiện 5A-C nối vào buồng gom 32, trong đó các khoang 5A-C chứa

thuốc thử hoá học dưới dạng thành phần thuốc thử sẽ phản ứng với chất đánh dấu tiên lượng, nếu có mặt, để sao cho sự dịch màu xảy ra, sự dịch màu này là nằm trong phổ nhìn thấy được sao cho có thể quan sát trực quan được. Cần hiểu rằng thuật ngữ “phổ nhìn thấy được” được dùng để chỉ phân phổ điện từ có thể phát hiện trực quan, thường là nằm trong khoảng từ 380nm đến 750nm.

Theo sáng chế, hệ thống thử nghiệm 1 có thể cho phép phát hiện trực quan trực tiếp chất đánh dấu được chọn từ nhóm gồm Hb, LDH, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), lactat, CK, K, Mg và Ca. Thực tế là, việc dụng cụ 2 dùng để phân tích chỉ cho LDH và Hb có thể trong một số ứng dụng là đủ.

Tuy nhiên, cũng có thể phát hiện các kết quả đọc (tức là sự dịch màu) bằng phương pháp phát hiện bằng phổ quang kế.

Cần hiểu rằng các mẫu của các dịch thể khác với hoặc là dưới dạng bỏ thể cho mẫu máu có thể dễ dàng được phân tích nhờ sử dụng hệ thống thử nghiệm theo sáng chế, ví dụ, nước tiểu, dịch não tủy (CSF) hoặc nước bọt. Bộ phận tách 3 nêu trên sẽ làm sạch mẫu, tách các hạt không được mong muốn hoặc các sa lắng có thể làm nhiễu phép phân tích.

Như được minh họa, ví dụ, trên các Fig.1A và Fig.B, dụng cụ dùng một lần 2 có dạng hộp chứa hình chữ nhật, tuy nhiên, hình dạng của dụng cụ không phải là một dấu hiệu chủ yếu của sáng chế, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này kỹ thuật này có thể dễ dàng lựa chọn hình dạng hoặc thiết kế thích hợp cho một ứng dụng nhất định. Dụng cụ 2 có thể còn được kết cấu từ các chất liệu, như chất dẻo trong suốt, như xycloro-olefin (COC), polyetylen terephtalat (PET) hoặc polymetyl metacrylat (PMMA) nhờ sử dụng phương pháp như đúc áp lực hoặc cán lớp. Tuy nhiên, sẽ tốt hơn nếu dụng cụ 2 có thích thước sao cho có thể xách tay được và đủ nhỏ để có thể dễ dàng cầm trên tay của kỹ thuật viên. Dụng cụ dùng một lần 2 nêu trên là có thể xách tay được và có chiều dài nằm trong khoảng từ 3-15 cm, tốt hơn là nằm trong khoảng 5-10cm, chiều rộng nằm trong khoảng 0,5-5cm, tốt hơn là nằm trong khoảng 2-4cm và chiều dày nằm trong khoảng 0,1-3 cm, tốt hơn là nằm trong khoảng 0,2-2,5cm. Tốt hơn là, dụng cụ dùng một lần 2 nêu trên có trọng lượng nằm trong khoảng 5-50g.

Dưới đây, việc sử dụng hệ thống thử nghiệm 1 sẽ được mô tả.

Mẫu dịch thể của động vật có vú, như mẫu máu nguyên vẹn, đầu tiên được cung cấp, tốt hơn là, nhưng không nhất thiết, nhờ ống mao quản 7 đã được nạp máu nguyên vẹn với lượng, ví dụ, khoảng 50 μ L. Ở bước tiếp theo, ống mao quản 7 được cắm vào khoang 6 của hộp chứa 2 để tạo mặt phân cách của mẫu máu 9 với dụng cụ dùng một lần 2 định vị mẫu máu 9 lên trên bộ lọc 31 của bộ phận tách huyết tương 3. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này kỹ thuật này sẽ hiểu rằng có thể có nhiều cách khác nhau để cấp mẫu chất lưu 9 vào trong hộp chứa 2, nhờ sử dụng bộ gom mẫu mao quản 7 hoặc các loại bộ gom mẫu khác. Ví dụ, mẫu 9 có thể được cấp trực tiếp lên trên bộ lọc 31, ví dụ, nhờ bộ gom mẫu dưới dạng pipet giải phóng một lượng mẫu lên nó. Do vậy, cũng cần phải hiểu rằng thiết kế của hộp chứa 2 có thể có dạng sao cho bộ lọc 31 được bố trí ở bề mặt trên của hộp chứa 2, được để lộ sao cho lượng mẫu 9 có thể được giải phóng trực tiếp lên trên nó. Áp suất âm được tạo ra nhờ cơ cấu tạo áp suất âm 14 (xem Fig.1C) nhờ đó mẫu máu 9 được lấy ra qua bộ lọc 31 sau đó các hạt được chọn, đặc biệt là các tế bào máu đỏ, được lọc ra. Huyết thanh (huyết tương) của mẫu đi qua bộ lọc 31 và được thu gom nằm trong buồng gom 32 và chuyển tiếp qua kênh vi dẫn 33 đi vào các khoang phát hiện khác nhau 5A-C tại các thuốc thử được đặt. Các chất đánh dấu sinh học tiên lượng có mặt trong huyết thanh sẽ phản ứng với các thuốc thử đã được đặt trong các khoang gây ra sự dịch màu trong khoang tương ứng, chúng có thể được phát hiện bởi người sử dụng để đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra ở động vật có vú (ví dụ, người) từ mẫu nguyên vẹn đã được thu thập.

Do đó, phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước:

- cung cấp mẫu dịch thể của động vật có vú bao gồm các hạt như các tế bào máu,
- tách các hạt nêu trên ra khỏi mẫu dịch thể bằng bộ phận tách,
- cho dịch thể đã được tách này tiếp xúc với thuốc thử hoá học để phát hiện trực tiếp,
- xác định xem lượng Hb trong dịch thể này là lớn hơn hay nhỏ hơn hơn trị số ngưỡng định trước, và khi lượng Hb nhỏ hơn trị số ngưỡng thì sẽ bao gồm bước:

- đánh giá tổng lượng lactatdehydrogenaza (LDH) trong dịch thể, và đánh giá nguy cơ đối với và/hoặc sự có mặt của sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra từ việc đánh giá mức LDH trong dịch thể.

Cần hiểu rằng phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện nhờ hệ thống thử nghiệm 1 theo sáng chế (ví dụ, bao gồm dụng cụ dùng một lần 2 có bộ lọc 31 và các khoang phát hiện 5A-C), nhưng khác ở chỗ các cách thức khác để thực hiện phương pháp này cũng có thể được xét đến. Ví dụ, điều được dự tính trước là kỹ thuật viên y tế có thể phân bổ mẫu đã được lọc 9' vào trong các giếng phản ứng và sau đó bổ sung thành phần thuốc thử mà chúng có thể, ví dụ, được phân phối trong các vật dụng dùng một lần đơn liều.

Fig.1C minh họa cho một phương án điển hình của hệ thống thử nghiệm 1 có cơ cấu 14 để tạo ra áp suất âm bên trong buồng gom 32 để đẩy huyết tương từ mẫu dịch thể đi qua bộ phận tách 3 và đi vào ít nhất hai khoang phát hiện 5A-B.

Theo một khía cạnh của sáng chế, cơ cấu 14 có thể thao tác bằng tay và được bố trí để tạo ra áp suất âm bên trong buồng gom 32 và các kênh vi dẫn 33, ví dụ, bơm nén xi phong 14 có lỗ thông hơi có thể bịt kín được 142. Theo phương án này, cơ cấu tạo áp suất âm 14 được tích hợp cùng với hộp chứa 2 và được nối với các khoang phát hiện 5A-C qua các kênh vi dẫn 141A, 141B. Việc tạo ra áp suất âm bên trong hộp chứa 2 có thể đạt được theo cách sau đây. Kỹ thuật viên nhấn lên bề mặt của hộp chứa 2 ở vị trí tương ứng với khu vực của cơ cấu tạo áp suất âm 14, tốt hơn là được chỉ ra trên bề mặt của hộp chứa 2. Không khí do vậy sẽ thoát ra khỏi các kênh vi dẫn 33, 141A, 141B, 81 của hộp chứa 2 qua lỗ thông hơi có thể bịt kín được 142. Sau khi nhả cơ cấu tạo áp suất âm 14, lỗ thông khí 142 tốt hơn là được bịt kín, ví dụ, nhờ một van chặn, hoặc người sử dụng bịt bằng tay lên lỗ 142. Điều này sẽ dẫn đến việc là sự nhả cơ cấu tạo áp suất âm 14 tạo ra áp suất âm bên trong hộp chứa 2 (ví dụ, do việc bơm xi phong phục hồi lại hình dạng ban đầu của nó) và các chất lỏng bên trong các kênh vi dẫn 33, 141A, 141B, 81 nhờ vậy sẽ được đẩy để dịch chuyển qua hệ thống thử nghiệm 1.

Dụng cụ dùng một lần có các vùng quan sát quang học 10A-C mà qua đó các khoang phát hiện tương ứng 5A-C có thể được quan sát, cho phép người sử dụng hoặc người chăm sóc sức khỏe có thể quan sát được một cách dễ dàng sự dịch màu. Đối với Hb, sẽ tốt hơn nếu sự dịch màu sẽ xảy ra chỉ khi mức Hb vượt

quá một mức đã định trước, mức này được thiết lập là trị số ngưỡng, trong đó các giá trị nằm trên ngưỡng biểu thị sự tan huyết. Nếu sự dịch màu quan sát được trong khoang 5A đối với Hb, thì xét nghiệm này vô hiệu và một xét nghiệm mới cần được thực hiện.

Liên quan tới các khoang phát hiện khác với khoang phát hiện cho Hb, sự dịch màu chỉ ra sự có mặt của chất đánh dấu. Các giải pháp khác nhau có thể có liên quan tới việc làm thích ứng thành phần thuốc thử và thiết kế biểu đồ tham chiếu đã chuẩn hóa cho việc thể hiện sự dịch màu có thể có. Theo một ví dụ, thành phần thuốc thử được thiết lập để biến đổi hoặc dịch màu chỉ khi chất đánh dấu có mặt với mức nằm trên một nồng độ đã định trước. Một tùy chọn khác đó là thành phần thuốc thử được thiết lập để biến đổi dần dần độ đậm màu khi gia tăng các nồng độ, trong trường hợp này độ đậm màu tỷ lệ với lượng chất đánh dấu có mặt trong dịch thể. Điều rõ ràng có thể có là khoang phát hiện sẽ không màu khi lượng chất đánh dấu nằm dưới một giới hạn đã thiết lập trước, ở trên giới hạn này màu sắc dường như sẽ mạnh liệt hoặc kém mãnh liệt hơn tùy thuộc vào nồng độ của chất đánh dấu.

Cường độ của màu sắc thay đổi được so sánh với khoảng hoặc hệ tham chiếu đã chuẩn hóa, nhờ vậy mức chất đánh dấu tương ứng có thể xác định được, và nguy cơ có tình trạng thiếu oxy được đánh giá. Hệ tham chiếu đã chuẩn hóa có thể được thiết kế theo các tiêu chí của thành phần thuốc thử, như đã mô tả ở trên, tức là nó có thể có dạng gồm nhiều đoạn màu sắc không liên tục, tốt hơn là ít nhất là hai đoạn màu sắc, trong đó lượng chất đánh dấu được ước tính bằng cách so sánh sự dịch màu ở khoang bất kỳ trong số các khoang phát hiện ứng với các đoạn màu sắc nhất định. Hệ tham chiếu đã chuẩn hóa được mô tả chi tiết hơn liên quan tới các Fig. 2 và Fig.3.

Cần hiểu rằng thuốc thử hoá học, được để trong các khoang phát hiện khác nhau, có thể là ở dưới dạng thuốc thử hoá học khô hoặc thuốc thử hoá học ướt tùy thuộc vào thiết kế của hệ thống thử nghiệm cụ thể.

Trong trường hợp các thuốc thử hoá học khô, theo một phương án điển hình của sáng chế, thành phần thuốc thử cho mỗi khoang phát hiện có thể được đặt nằm trong bao gói kiểu phòng bảo vệ nằm trong hộp chứa 2 nối với cả hai khoang phát hiện 5A, 5B. Liên quan tới quá trình bắt đầu xét nghiệm bằng hệ theo sáng chế,

bao gói kiểu phòng này được bố trí để vỡ, nhờ vậy giải phóng các chất trong nó là thành phần thuốc thử nêu trên. Mẫu được đưa vào 9' nhờ vậy sẽ trộn lẫn với thành phần thuốc thử ướt và phản ứng sẽ bắt đầu, miễn là mẫu có chất đánh dấu tương ứng. Việc làm vỡ bao gói kiểu phòng nêu trên có thể được thực hiện bằng tay, ví dụ, bởi việc người sử dụng bóp lên bề mặt của dụng cụ dùng một lần 2 để sao cho các mặt của hộp chứa 2 được ép đủ để làm cho phòng rộp đã tích hợp bị vỡ.

Ngoài ra, trong trường hợp thuốc thử hoá học khô, các thuốc thử được chọn được làm khô bên trong các khoang phát hiện. Khi mẫu dịch 9' đi vào các khoang tương ứng, các thuốc thử đã làm khô sẽ bắt đầu bị hoà tan để sao cho phản ứng có thể bắt đầu. Để tạo thuận lợi cho việc hydrat hoá lại các thành phần phản ứng, được ưu tiên nếu bổ sung chất phản ứng mang vào thuốc thử hoá học khô.

Như đã nêu, sự tương tác hoá học giữa thành phần thuốc thử nằm trong khoang phát hiện 5A-C và chất đánh dấu gây ra sự dịch màu để cảnh báo cho kỹ thuật viên về nguy cơ sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra. Để đảm bảo độ tin cậy của hệ thống thử nghiệm 1, điều được mong muốn là phản ứng xảy ra bên trong khoang phát hiện 5A-C được giới hạn trong một khoảng thời gian định trước để sao cho tất cả các đơn vị xét nghiệm đều tương đương. Vì lý do này, dụng cụ dùng một lần 2 có thể có khoang 8 có chất dừng phản ứng để dừng phản ứng giữa chất đánh dấu sinh học và thành phần thuốc thử với một thời gian đã định trước sau khi người xét nghiệm đã tạo áp suất dịch lưu âm. Điều này có nghĩa là khoảng thời gian tính từ thời điểm mẫu máu bắt đầu được rút ra qua bộ lọc 31 cho tới khi chất dừng phản ứng ngắt phản ứng giữa chất phản ứng và chất đánh dấu sinh học, thường là như nhau.

Điều rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này kỹ thuật này là thay vì chất dừng phản ứng có thể thiết lập một bộ bấm giờ, và sau một khoảng thời gian định trước nhất định đánh giá có dịch màu xảy ra hay không.

Một ví dụ về đường bao của chất dừng phản ứng 8 là được thể hiện trên Fig.1A trong đó dụng cụ dùng một lần 2 bao gồm khoang 8 chứa chất hoặc hợp chất thích hợp để ngắt hoạt tính bằng enzym, ví dụ, dung dịch kiềm hoặc axit như HCl, axit xitric hoặc NaOH. Ngoài ra, có thể sử dụng các chất hoạt động bề mặt

hoặc các chất phụ gia khác làm chất dừng phản ứng, ví dụ, natri dodecyl sulphat (SDS) đã được chứng tỏ là có khả năng tốt làm chất dừng phản ứng.

Theo một phương án của sáng chế, khi áp suất âm được tạo ra chất dừng phản ứng sẽ bắt đầu chảy qua kênh vi dẫn 81 hướng tới khoang phát hiện 5B trong đó nó được dự liệu cho việc dừng phản ứng. Độ dài của kênh vi dẫn 81 sẽ quyết định khoảng thời gian mà chất dừng phản ứng đi tới khoang 5B. Trên Fig.1A, kênh vi dẫn 81 là kênh dẫn dạng xoắn ruột gà để kéo dài thời gian trước khi phản ứng được dừng, tuy nhiên nhiều cách khác để điều chỉnh chiều dài của kênh dẫn 81 là có khả năng tương đương.

Điều rõ ràng là có thể tương đương nếu bố trí hộp chứa 2 sao cho mẫu 9' đã trộn với thành phần thuốc thử sẽ dịch chuyển vào khoang được bố trí cùng với chất dừng phản ứng cố định 8 sau khi một khoảng thời gian phản ứng nhất định, ví dụ, qua kênh vi dẫn 81. Theo phương án như vậy, chất dừng phản ứng cố định 8 có thể là ở dưới dạng chất dừng phản ứng ướt hoặc đã được làm khô.

Fig.1B thể hiện dưới dạng sơ đồ, mặt cắt của dụng cụ dùng một lần 2 cùng với cửa nạp mẫu 4 dưới dạng cửa nạp mẫu được nối vào khoang 6 đã được làm thích ứng để tiếp nhận ống mao quản 7 chứa mẫu máu nguyên vẹn 9 được bố trí để đặt lên trên bộ phận tách huyết tương 3. Tốt hơn, nếu cửa nạp mẫu 4 được bao quanh bởi phần lõm gài dạng phễu để dẫn hướng cho bộ gom mẫu mao quản 7 ấn vào khoang 6. Ở đây có thể nhìn thấy các vùng quan sát quang học 10A nêu trên cho phép quan sát phản ứng diễn ra bên trong các khoang phát hiện 5A-B.

Các Fig.2A và Fig.2B thể hiện một ví dụ về dụng cụ dùng một lần 2 theo sáng chế. Fig.2A là hình vẽ nhìn từ trên xuống, và Fig.2B là hình vẽ mặt cắt theo đường IIB trên Fig.2A. Theo phương án này, dụng cụ 2 được cung cấp máu xét nghiệm 9 bởi ống mao quản 7 đã chứa máu nguyên vẹn với lượng lên tới, ví dụ, khoảng 50 μ L. Tùy thuộc vào người bệnh và/hoặc vào thiết kế cụ thể của dụng cụ 2 (ví dụ, số lượng khoang phát hiện, kích thước của các kênh dẫn v.v.), các lượng khác nhau của mẫu máu là có thể được áp dụng, và có thể sử dụng nhỏ tới mức 1 μ L, hoặc nhiều tới 100 μ L, lượng được ưu tiên là nằm trong khoảng 25-75 μ L.

Để tạo thuận lợi cho việc gài mẫu, vùng xung quanh cửa nạp mẫu 4 được làm lõm để dẫn hướng ống mao quản 7 ấn vào khoang 6. Trên Fig.2A, ống mao quản 7 đã được ấn vào khoang 6 của hộp chứa 2 để tạo mặt phân cách của mẫu

máu 9 với hộp chứa 2 và đưa mẫu máu 9 lên trên bộ lọc 31 của bộ phận tách huyết tương 3. Thay vì sử dụng ống mao quản 7, có thể cung cấp mẫu 9 bởi pipet nhỏ một giọt mẫu lên trên vùng đã được đánh dấu trên hộp chứa 2. Áp suất âm được tạo ra bằng tay và huyết tương được đẩy qua bộ lọc 31 và đi vào buồng gom huyết tương 32 từ đó nó đi qua kênh vi dẫn 33 và được phân bố vào các khoang phát hiện khác nhau 5A-C. Như thấy được trên Fig.2B, hệ thống thử nghiệm bao gồm các vùng quan sát quang học 10B trong đó ít nhất là các phần 10-A-C của dụng cụ dùng một lần 2 ở trên mỗi khoang phát hiện 5B là trong suốt, tức là mỗi khoang phát hiện 5B là có thể nhìn thấy được và có thể quan sát được trong khi phản ứng diễn ra.

Theo một phương án, mỗi khoang phát hiện 5A-C được điều chế bằng một thành phần thuốc thử được bố trí để phản ứng với một trong số các chất đánh dấu tiên lượng sau đây: Hb, LDH, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), lactat, CK, K, Mg và Ca. Tốt hơn là, mỗi dụng cụ 2 bao gồm ít nhất hai khoang phát hiện 5A-B lần lượt để phát hiện Hb và LDH, và tùy ý một hoặc nhiều khoang phát hiện để phát hiện cho một hoặc nhiều trong số AST, ALT, lactat, CK, K, Mg và Ca.

Sau một khoảng thời gian định trước, phản ứng được dừng bởi chất dừng phản ứng và sự dịch màu bất kỳ được phát hiện trực quan bởi người sử dụng hệ thống thử nghiệm 1. Tổng thời gian từ lúc cung cấp mẫu máu 9 trong 2A tới lúc xác định kết quả xét nghiệm trong 2C là dưới 5 phút, nhưng tốt hơn là trong vòng hai phút.

Fig.2A thể hiện hình chiếu nhìn từ trên xuống của hệ thống thử nghiệm mà theo đó phản ứng có thể có xảy ra trong các khoang phát hiện 5A-C. Để xác định lượng của các chất đánh dấu tiên lượng, sự dịch màu (nếu có) trong mỗi khoang phát hiện 5A-C được so sánh với khoảng tham chiếu tiêu chuẩn, tốt hơn là nó được cung cấp cùng với hệ thống thử nghiệm. Theo một phương án của sáng chế, vùng bên cạnh mỗi khoang phát hiện 5A-C có nhiều màu sắc tham chiếu 11 nhờ đó việc đánh giá mức độ chất đánh dấu được tiến hành một cách dễ dàng. Ở đây, khoang phát hiện 5A được bố trí để xác định sự có mặt của Hb, và 5B-C được bố trí để xác định hoặc ước tính các mức của các chất đánh dấu tiên lượng khác bất kỳ (LDH, AST, ALT, lactat, CK, K, Mg hoặc Ca).

Ví dụ, trên Fig.2A một tình huống được lấy làm ví dụ trong đó không xảy ra sự dịch màu trong khoang cho Hb 5A, chứng tỏ rằng xét nghiệm này không có hiệu lực. Một phản ứng xảy ra trong khoang 5B, sự dịch màu này cấu thành một trong số các màu tham chiếu nhất định 11, trong khi phản ứng đáng kể không xảy ra trong các khoang 5C. Tốt hơn là, người sử dụng hệ thống thử nghiệm 1 được chỉ báo phản ứng khi sự dịch màu tạo ra một độ đậm màu nhất định. Các chỉ báo như vậy có thể được đánh dấu theo khoảng tham chiếu, ví dụ dưới dạng ký hiệu chỉ báo các phần của của khoảng tham chiếu thể hiện nguy cơ của tình trạng thiếu oxy.

Trên Fig.2A, tham chiếu tiêu chuẩn 11 cho các khoang 5B-C có ba đoạn màu sắc, tuy nhiên người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này kỹ thuật này sẽ hiểu rằng một số lượng lớn các đoạn màu sắc có thể có để nâng cao độ chính xác của việc đọc, cũng như có thể có khoảng màu liên tục thay vì, như được thể hiện ở đây, các đoạn màu sắc không liên tục.

Một ví dụ khác nữa về khoảng tham chiếu 11 có thể có được thể hiện trên Fig.3 trong đó tham chiếu tiêu chuẩn 11 chỉ có hai đoạn màu sắc, tức là việc đọc sẽ chỉ cung cấp cho người sử dụng duy nhất kết quả âm tính hoặc dương tính. Một thiết kế như vậy của tham chiếu tiêu chuẩn là thích hợp trong các tình huống y học mà có thể đặt trước giới hạn nồng độ mà ở trên giới hạn này thường đòi hỏi việc đưa ra tác động y học, hoặc trong các trường hợp mà việc đọc nhanh và đơn giản là quan trọng hơn so với việc xác định chính xác định lượng về lượng chất đánh dấu.

Các hệ thống thử nghiệm 4A-B theo các ví dụ khác của sáng chế được thể hiện trong trong đó thay vì có thiết kế dạng hộp chứa, thì dụng cụ dùng một lần 2 được tạo ra một cách đơn giản ở dạng que có thân kéo ra được có hai mặt ngấn đối diện 21, 21'. Theo ví dụ này, cửa nạp mẫu là cửa nạp mẫu 4 được bố trí ở mặt ngấn 21 của dụng cụ dùng một lần 2 (liên quan tới các Fig.4A-B còn được gọi là "que thử 2").

Hai dạng thiết kế của que thử 2 được minh họa. Que thử 2 thứ nhất được thể hiện dưới dạng sơ đồ trên Fig.4A có phần tiếp nhận với khoang 6 tương tự như được thể hiện trên các Fig.1-2. Một ưu điểm cụ thể của khoang 6 của que thử 2 đó là nó có thể được bố trí để tiếp nhận toàn bộ ống mao quản 7 để sao cho không có

phần nào của mao quản 7 nhô ra ngoài que thử 2 sau khi được ấn vào trong khoang 6. Nhờ vậy, các que thử 2 sau khi sử dụng có thể được bỏ đi ở dạng nguyên vẹn là điều có lợi xét theo khía cạnh gây ô nhiễm do các ống mao quản chứa máu và không sử dụng nữa sẽ được bỏ đi và có thể vô tình bị vỡ.

Que thử 2 thứ hai được minh họa dưới dạng sơ đồ trên Fig.4B và bao gồm thành phần ống mao quản 7 nhô ra khỏi một đầu ngắn 21 và nối thẳng trực tiếp với bộ phận tách huyết tương 3 bên trong que thử 2. Nhờ vậy, mẫu máu 9 có thể được thu gom thẳng vào dụng cụ 2 mà không cần phải sử dụng mao quản 7 dưới dạng một bộ phận riêng biệt.

Có lợi, nếu phương pháp theo các phương án của sáng chế cho phép được áp dụng để xác định tình trạng thiếu oxy trong nhiều tình huống khác nhau. Ví dụ, phương pháp theo các phương án của sáng chế được áp dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp xác định sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra ở trẻ sơ sinh bằng cách phân tích mẫu máu lấy từ trẻ sơ sinh, ví dụ, bằng cách phân tích mẫu lấy từ dây rốn.

Phương pháp theo các phương án của sáng chế còn có thể cho phép được áp dụng để xác định tình trạng thiếu oxy ở đường dạ dày ruột (ví dụ, mạch đôi tiếp hợp đại tràng), các cơ quan đặc biệt (ví dụ, gan và động mạch chủ), dịch não tủy lấy từ lưng, và các cơ quan cấy ghép. Ngoài ra, phương pháp theo các phương án của sáng chế cho phép đánh giá và/hoặc theo dõi sự rò rỉ tế bào từ một một hoặc nhiều hệ cơ quan ở bệnh nhân đã có bệnh và/hoặc có nguy cơ cao mắc bệnh (ví dụ, ở các động vật có vú dễ bị các rối loạn chức năng đa cơ quan, ví dụ, liên quan tới chấn thương, nhiễm trùng, xuất huyết hoặc phẫu thuật lớn), dự báo tổn thương não do ngạt ở trẻ sơ sinh (bệnh não do ngạt và thiếu oxy máu, HIE), và theo dõi hệ tuần hoàn ngoại vi của động vật có vú.

Các chất đánh dấu tiên lượng khác nhau và sự kết hợp của các chất đánh dấu tiên lượng đã được chứng minh là hữu ích cho việc đánh giá tình trạng thiếu oxy trong các tình huống y học khác nhau như được mô tả một cách chi tiết hơn trong US2008/0213744.

LDH có mặt trong tất cả các mô cơ thể và là một chất đánh dấu lý tưởng cho sự tổn thương tế bào chung. Tuy nhiên, bằng cách kết hợp với các chất đánh

dấu khác, tình trạng lâm sàng có thể sẽ rõ ràng hơn. Dưới đây đưa ra một vài ví dụ về sự kết hợp của các chất đánh dấu đáng quan tâm ở các tình huống y học cụ thể.

LDH kết hợp với chất đánh dấu đặc thù cơ quan như ALT (đặc thù cho gan).

LDH kết hợp với lactat và/hoặc Mg là các chất đánh dấu cấp tính hơn về tình trạng giảm oxy không khí thở vào thường có trong toàn bộ cơ thể hoặc trong mô đặc hiệu.

LDH kết hợp với AST và ALT, chúng có thời gian bán hủy khác nhau trong huyết tương ở dạng kết hợp là một chất đánh dấu kế thừa hiệu lực cho tình trạng giảm oxy không khí thở vào đã xảy ra từ trước. Về khía cạnh pháp y, cho phép tiến hành điều tra hồi cứu khi trẻ sơ sinh bị chết do ngạt.

Dưới đây, một vài tình trạng bệnh y học được đưa ra trong đó tình trạng thiếu oxy là một vấn đề nghiêm trọng và do đó hệ thống thử nghiệm theo sáng chế sẽ có thể có lợi.

Trong khi hoặc chuẩn bị sinh, việc đánh giá tình trạng thiếu oxy cho phép tiên lượng ngạt thai nhi và/hoặc tổn thương não do ngạt trước khi sinh (ví dụ, HIE). Trong tình huống tổn thương não được dự báo, trẻ sơ sinh được áp dụng điều trị hạ nhiệt nhờ đó sự phát triển của chứng thiếu máu cục bộ do giảm oxy không khí thở vào (HIE) có thể tránh được. Bằng cách này, đưa ra được một cách thử dễ dàng và nhanh chóng để nhận diện cho trẻ sơ sinh có nguy cơ phát triển HIE, nhờ vậy có thể giảm bớt tỷ lệ trẻ em bị tổn thương não, đặc biệt là ở các nước có hệ thống chăm sóc y tế hiện thời chưa đủ tiên tiến để chăm sóc trẻ sơ sinh.

Trong tình huống phân tầng nguy cơ, mục tiêu là rút ngắn thời gian chờ đợi cho bệnh nhân để sao cho các trường hợp nguy cấp nhất được điều trị đầu tiên. Việc đánh giá tình trạng thiếu oxy bằng cách xác định một hoặc nhiều chất đánh dấu tiêu biểu là một cách thức để rút ngắn thời gian bệnh nhân phải nằm trong phòng chờ.

Theo một phương án, mẫu máu tham chiếu thứ nhất được lấy từ khu vực được nghiên cứu trước khi tiến hành thủ thuật y khoa và được phân tích cho các chất đánh dấu tiên lượng nhờ sử dụng hệ thống thử nghiệm theo sáng chế. Trước khi hoàn tất thủ thuật y khoa, mẫu máu thứ hai có thể được lấy từ vị trí được nghiên cứu và được phân tích theo cách giống như mẫu ban đầu. Việc xác định

các chất đánh dấu tiên lượng trong các mẫu thứ nhất và thứ hai có thể được so sánh để đánh giá sự có mặt của sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra. Theo các phương án khác, các đa chất đánh dấu tiên lượng được xét nghiệm.

Các phương án như vậy bao gồm việc xác định hàm lượng của ít nhất là Hb và LDH trong huyết tương ở cả các mẫu máu tham chiếu lẫn các mẫu máu cuối, và tùy ý là một hoặc nhiều chất đánh dấu tiên lượng bổ sung được chọn từ nhóm gồm chủ yếu là K, Mg, Ca, AST, ALT, CK và lactat. Do đó, các lượng tương ứng của mỗi chất đánh dấu tiên lượng ở các mẫu thứ nhất và thứ hai có thể được so sánh để xác định vị trí thích hợp cho việc nối. Theo một phương án, thủ thuật y khoa bao gồm phẫu thuật nối đường dạ dày ruột.

Theo một khía cạnh khác, các phương án theo sáng chế có thể áp dụng được để giảm bớt tình trạng bệnh và tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân sau khi cấy ghép trị liệu. Một trong những yếu tố quan trọng tác động đến tình trạng bệnh và tỷ lệ tử vong sau khi cấy ghép có liên quan tới tổn thương bảo toàn của mảnh ghép, như mảnh ghép gan trong cấy ghép gan. Ví dụ, LDH, AST và ALT rò rỉ vào dịch truyền là một chỉ báo về sự thiếu tích hợp màng của các tế bào gan.

Theo một phương án như vậy, phương pháp để xác định sự có mặt của sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra trong cơ quan để cấy ghép vào động vật có vú có thể bao gồm các bước cung cấp mẫu máu và phân tích mẫu này, như được mô tả ở trên, cho các chất đánh dấu tiên lượng trước khi phẫu thuật cấy ghép. Theo một phương án, mẫu được xét nghiệm để xác định sự có mặt của Hb và tổng lượng LDH và ít nhất một chất đánh dấu tiên lượng bổ sung trong mẫu được chọn từ nhóm gồm chủ yếu là K, Mg, Ca, AST, ALT, CK và lactat. Theo một phương án được ưu tiên, cơ quan dùng để cấy ghép là gan.

Theo một khía cạnh khác nữa, phương pháp theo các phương án của sáng chế có thể được sử dụng để đánh giá tình trạng của chân tay động vật có vú trước và sau khi điều trị y tế hoặc phẫu thuật. Ví dụ, chấn thương, gãy xương và tắc mạch có thể ảnh hưởng tới sự tuần hoàn máu tới các cơ và các chi ngoại vi (ví dụ, hội chứng chèn ép khoang). Như cũng được mô tả trong US2008/0213744, có một mối tương quan đáng kể giữa oxy trong cơ thiếu máu cục bộ và các lượng lactat và LDH, và lactat tăng cao trong máu đùi ở bệnh nhân bị tắc động mạch ngoại vi so với các trị số đối chứng. Các dụng cụ theo sáng chế có thể cho phép sử dụng các

mức enzym và lactat để chẩn đoán tình trạng thiếu máu cục bộ của chi cụ thể và cũng để đánh giá hiệu quả của phần lớn các điều trị.

Ngoài ra, các phương án theo sáng chế bao gồm phương pháp để xác định tình trạng thiếu oxy-thiếu máu cục bộ bằng cách phân tích mẫu từ chi được quan tâm và xác định tổng lượng LDH trong huyết tương. Ngoài ra đường bao cho mô thay đổi trong quá trình cắt chân tay sẽ có thể được đánh giá trong khi phẫu thuật nhờ sử dụng này. Các chất đánh dấu tiên lượng bổ sung có thể được xác định đồng thời với việc xác định LDH. Điều này cho phép đánh giá sự lưu thông máu tới các chi của động vật có vú trước và sau khi thủ thuật y khoa hoặc phẫu thuật.

Các phương án theo sáng chế bao gồm dụng cụ và phương pháp để xác định sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra ngay tại chỗ, trong đó các kết quả có thể có được trong vòng tối đa vài phút. Các phương án như vậy bao gồm việc chuẩn bị mẫu để phân tích và xác định Hb và LDH. Theo các phương án được ưu tiên, phương pháp này bao gồm việc xác định hàm lượng của ít nhất là một chất đánh dấu tiên lượng bổ sung trong huyết tương được chọn từ nhóm gồm chủ yếu là AST, ALT và lactat.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các thành phần thuốc thử dùng cho LDH và Hb lần lượt được mô tả tiếp trong các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế từ 1 đến 6, trong đó các Ví dụ từ 1 đến 4 liên quan tới việc phát hiện LDH và các Ví dụ 5 và 6 liên quan tới việc phát hiện Hb.

Ví dụ 1

Muối tetrazoli, nitro tetrazoli xanh (NBT), 2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazoli clorua (INT) và 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxypheyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli (MTS) được hòa tan riêng biệt trong trong dimetyl sulphoxit tạo ra các dung dịch nguyên liệu 10mM. Các chất trung gian phenazin metosulphat (PMS) và 1-metoxy-5-metylphenazini metylsulfat (mPMS) được hòa tan riêng biệt trong nước tạo ra các dung dịch nguyên liệu 1mM. Dung dịch nguyên liệu NAD được điều chế trong chất đệm. Natri lactat được hòa tan trong nước, và độ pH được điều chỉnh tới khoảng 9 bằng

dung dịch tris 1M.

Các mẫu huyết thanh đối chứng (lần lượt là 2,2 và 4,7 μ katal/l) và mẫu máu từ các cộng sự được sử dụng.

Các mẫu máu được thu gom trong ống Li-heparin bằng bộ tách (Vacuette, Greiner) và ống kali-EDTA (Vacuette, Greiner). Ống này được ly tâm trong 15 phút với tốc độ 1500 vòng/phút và huyết tương được chuyển vào ống Eppendorf.

Thử nghiệm enzym được thực hiện nhờ sử dụng phổ quang kế thông thường bằng cách sử dụng phổ quang kế Shimadzu UV-VIS 1610 có sử dụng các cuvet loại 1ml bằng chất dẻo, ngoài việc kiểm tra trực quan. Các hỗn hợp phản ứng này được điều chế theo Bảng 1, và các phản ứng được khơi mào bằng cách bổ sung 50 μ l NAD.

Bảng 1. Hỗn hợp phản ứng

Chất đệm Tris/HCl	800 μ l
Nguyên liệu tetrazoli (10mM)	50 μ l
Nguyên liệu trung gian (1mM)	50 μ l
Nguyên liệu lactat (0,8M)	50 μ l
Mẫu (huyết tương hoặc huyết thanh đối chứng)	200 μ l
NAD	50 μ l

Các kết quả

NBT thể hiện màu xanh thẫm, INT có màu tím và MTS có màu nâu-đỏ sau khi phản ứng, tạo ra sự dịch màu sau một khoảng thời gian phản ứng nhất định.

Ví dụ 2

Các thử nghiệm đã được thực hiện bằng cách sử dụng máy đọc đĩa ELISA của hãng Emax Molecular Devices, nhờ sử dụng các đĩa có 96 lỗ ngoài việc kiểm tra trực quan. Đáy của đĩa có 96 lỗ này được sử dụng làm bề mặt quang để đo và mỗi lỗ có thể chứa tối đa 400 μ l dịch lỏng. Mức độ hấp thụ sẽ thay đổi phụ thuộc vào độ sâu của dung dịch trong các lỗ. Các đĩa được sử dụng trong thử nghiệm này là của hãng NUNC (có khả năng gắn kết cao).

Muối tetrazoli, nitro tetrazoli xanh (NBT), 2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazoli clorua (INT) và 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli (MTS) được hòa tan riêng biệt trong trong dimethyl sulphoxid tạo ra các dung dịch nguyên liệu 10mM. Các chất trung gian phenazin metosulphat (PMS) và 1-metoxi-5-metylphenazini metylsulfat (mPMS) được hòa tan riêng biệt trong nước tạo ra các dung dịch nguyên liệu 1mM. Các dung dịch nguyên liệu NAD và NADH được điều chế trong chất đệm. Natri lactat được hòa tan trong nước, và độ pH được điều chỉnh tới khoảng 9 bằng dung dịch tris 1M.

Các mẫu huyết thanh đối chứng (lần lượt là 2,2 và 4,7 μ katal/l) và mẫu máu lấy từ các cộng sự được sử dụng.

Các mẫu máu được thu gom trong ống Li-heparin bằng bộ tách (Vacuette, Greiner) và ống kali-EDTA (Vacuette, Greiner). Ống này được ly tâm trong 15 phút với tốc độ 1500 vòng/phút và huyết tương được chuyển vào ống Eppendorf.

Việc đo hoạt tính enzym được thực hiện với tổng thể tích lần lượt là 100 và 50 μ l.

Bảng 2: Hỗn hợp phản ứng cho thể tích phản ứng 100 μ l:

Chất đệm Tris/HCl	5 μ l
Nguyên liệu tetrazoli (10mM)	5 μ l
Chất trung gian (1mM)	5 μ l
Nguyên liệu lactat (0,8M)	5 μ l
Mẫu	75 μ l
NAD ⁺	5 μ l

Mẫu này cũng được thử nghiệm ở dạng đã pha loãng khi sử dụng mẫu máu, tương ứng với lượng huyết tương dưới 20 μ l.

Bảng 2: Hỗn hợp phản ứng cho thể tích phản ứng 50 μ l:

Mẫu 3	7,5 μ l
Hỗn hợp phản ứng	12,5 μ l

Mẫu này cũng được thử nghiệm ở dạng đã pha loãng khi sử dụng mẫu máu,

tương ứng với lượng huyết tương dưới 10 μ l.

Hỗn hợp phản ứng: Các thể tích bằng nhau của dung dịch nguyên liệu muối tetrazoli, dung dịch nguyên liệu trung gian, các nguyên liệu lactat và NAD⁺ được trộn trước khi bổ sung vào mẫu.

Các kết quả

Các thay đổi về màu sắc đã được quan sát một cách đầy đủ cho tất cả các thuốc nhuộm muối tetrazoli.

NBT là rất thích hợp cho việc phát hiện trực quan hoạt tính LDH. Cả PMS lẫn mPMS đều có thể dùng làm các chất trung gian, tuy nhiên mPMS là được ưu tiên do nó khó bị phân hủy quang hóa hơn. Điều đáng ngạc nhiên là các ví dụ cho thấy rằng các lượng nhỏ, thậm chí là dưới 10 μ l, là đủ để tạo ra sự dịch màu có thể chấp nhận được cho việc phát hiện trực quan.

Ví dụ 3

Ví dụ 3 dưới đây đề cập tới thành phần thuốc thử ướt để đánh giá sự có mặt của LDH trong mẫu huyết tương.

Muối tetrazoli, nitro tetrazoli xanh (NBT), được hòa tan trong dimethyl sulphoxid tạo ra dung dịch nguyên liệu 10mM. Chất trung gian 1-metoxi-5-methylphenazini metylsulfat (mPMS) được hòa tan trong riêng biệt trong nước tạo ra các dung dịch nguyên liệu 1mM. Dung dịch nguyên liệu NAD⁺ được điều chế trong chất đệm. Natri lactat được hòa tan trong nước. N-metyl-D-glucosamin được hòa tan trong nước (1M) và độ pH được điều chỉnh tới 10 bằng HCl.

Các mẫu huyết thanh đối chứng (lần lượt là 2,2 và 4,7 μ katal/l) và mẫu máu lấy từ các cộng sự được sử dụng.

Các mẫu máu được thu gom trong ống Li-heparin bằng bộ tách (Vacuette, Greiner) và ống kali-EDTA (Vacuette, Greiner). Ống này được ly tâm trong 15 phút với tốc độ 1500 vòng/phút và huyết tương được chuyển vào ống Eppendorf.

Hỗn hợp phản ứng: các thể tích bằng nhau của dung dịch nguyên liệu muối tetrazoli, dung dịch nguyên liệu trung gian, các nguyên liệu lactat và NAD⁺ được trộn trước khi bổ sung vào mẫu.

Việc đo hoạt tính enzym được thực hiện với tổng thể tích lần lượt là 100 μ l

gồm 80 μ l hỗn hợp phản ứng và 20 μ l mẫu.

Các kết quả

Các thay đổi về màu sắc đã được quan sát một cách đầy đủ. Các dịch màu được phát hiện trực quan và bằng phổ quang kế.

Ví dụ 4

Ví dụ 4 dưới đây đề cập tới thành phần thuốc thử khô để đánh giá sự có mặt của LDH trong mẫu huyết tương.

Các dung dịch nguyên liệu theo Bảng 4 được điều chế.

Bảng 4. Hỗn hợp phản ứng

NBT (10mM)

mPMS (2,5mM)

NAD (50mM)

L-lactat (5M)

NMG (2M)

Sử dụng các dung dịch nguyên liệu, NMG (0,61 ml), NAD (0,467 ml), L-lactat (0,440ml), NBT (1,21 ml) và mPMS (0,997 ml) được trộn và được làm khô trên một tấm chất dẻo.

Sau khi làm khô, 5 μ l huyết tương đã mót LDH được phủ lên ván bìa và phản ứng được để xảy ra trong 2 phút. Phản ứng được dừng lại bằng dung dịch HCl 2M.

Các kết quả

Sự khác nhau về màu sắc giữa các mức LDH cao và thấp quan sát được một cách rõ rệt.

Ví dụ 5

Ví dụ 5 dưới đây đề cập tới thành phần thuốc thử ướt cho việc đánh giá Hb trong huyết tương.

Các dung dịch thuốc thử được điều chế như sau. Các hợp chất sinh màu,

N,N,N',N'-tetramethylbenzidin (TMB) và 3,3'-diaminobenzidin (DAB) được hòa tan riêng biệt trong dimethyl sulphoxit hoặc trực tiếp trong dung dịch chất đệm (chất đệm phosphat-xitrat). Các chất hydro peroxit, và tert-butylhydroperoxid (T-hydro) được hòa tan riêng biệt trong các hợp chất sinh màu tương ứng. Độ pH được điều chỉnh nằm trong khoảng 4-7.

Lượng 90µl của dung dịch thuốc thử và 10µl mẫu huyết tương được trộn cho phản ứng.

Các kết quả

Màu sắc được thay đổi đầy đủ cho mỗi dung dịch thuốc thử tương ứng. TMB dịch màu từ màu vàng trong suốt (không có mặt Hb) sang màu xanh lá cây (có mặt Hb). DAB dịch màu từ trong suốt (không có mặt Hb) sang màu nâu (có mặt Hb). Các dịch màu được phát hiện trực quan và bằng phổ quang kế.

Ví dụ 6

Ví dụ 6 dưới đây đề cập tới thành phần thuốc thử khô dùng cho việc đánh giá Hb có trong huyết tương.

Hỗn hợp thuốc thử gồm TMB, hydro peroxit và chất đệm (độ pH = 5,5) được làm khô trên tấm chất dẻo và được hydrat hoá lại bằng mẫu huyết tương 10µl chứa các lượng đã móc của Hb. Sau khi hydrat hoá lại, nồng độ TMB là 0,2mg/ml, hydro peroxit 0,04% và chất đệm 50mM.

Các kết quả

Sự biến đổi màu từ khi thử nghiệm thể hiện sự mô tả tốt đối với các mẫu có các nồng độ khác nhau của Hb, với độ đậm màu tăng khi các nồng độ Hb tăng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận thấy rằng nhiều cải biến khác nhau có thể được tạo ra mà không cần tới kỹ năng sáng tạo, không thuộc phần mô tả nêu trên, ví dụ, sử dụng thủy tinh hoặc một số vật liệu thích hợp khác trong chất dẻo v.v.. Hơn thế nữa, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là việc phân tích các kết quả thử nghiệm (các dịch màu) bằng phương pháp phổ đo màu trong phổ nhìn thấy được.

Nhiều cải biến và các phương án khác theo sáng chế đã nêu trong phần mô

tả sẽ giúp người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được lợi ích của phần mô tả nêu trên và các hình vẽ kèm theo. Do đó, cần phải hiểu rằng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể đã nêu và các cải biến và các phương án khác dự định nằm trong yêu cầu bảo hộ kèm theo. Mặc dù các thuật ngữ cụ thể được sử dụng trong phần mô tả này, nhưng chúng chỉ được sử dụng theo nghĩa chung và mang tính chất mô tả, chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hệ thống thử nghiệm dùng để đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra ở động vật có vú kể cả người, bao gồm dụng cụ dùng một lần (2) có cửa nạp mẫu (4) và buồng gom (32) được bố trí cùng với bộ phận tách (3), khác biệt ở chỗ, buồng gom (32) được nối với ít nhất hai khoang phát hiện trực quan thứ nhất (5A) và thứ hai (5B), trong đó ít nhất một khoang được bố trí cùng với thuốc thử hoá học để phát hiện trực tiếp, khoang phát hiện thứ nhất này (5A) được bố trí để xác định xem lượng hemoglobin (Hb) có trong mẫu dịch thể (9) của động vật có vú có vượt quá một lượng định trước hay không, và khoang phát hiện thứ hai (5B) được bố trí để đánh giá tổng lượng lactat dehydrogenaza (LDH) có trong mẫu nhờ thuốc thử hoá học.
2. Hệ thống thử nghiệm theo điểm 1, trong đó ít nhất hai khoang phát hiện (5A, 5B) được bố trí cùng với thuốc thử hoá học để lần lượt phát hiện trực tiếp các lượng của Hb và LDH.
3. Hệ thống thử nghiệm theo điểm 2, trong đó ít nhất hai khoang phát hiện trực quan (5A, 5B) được bố trí cùng với thuốc thử hoá học để phát hiện trực quan trực tiếp bằng cách so màu.
4. Hệ thống thử nghiệm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ít nhất hai khoang phát hiện trực quan (5A, 5B) được bố trí cùng với thuốc thử hoá học để phát hiện trực tiếp bằng phổ quang kế.
5. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó bộ phận tách (3) có bộ lọc tách (31) với diện tích nằm trong khoảng từ 3mm^2 đến 500mm^2 , tốt hơn là nhỏ hơn 150mm^2 .
6. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó mẫu nêu trên là mẫu máu nguyên vẹn (9) và bộ phận tách (3) có bộ lọc (31) dùng

để tách huyết tương (9') ra khỏi các tế bào máu nằm trong mẫu máu nguyên vẹn (9).

7. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó mẫu nêu trên là dịch thể bất kỳ trong số huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, dịch não tủy (CSF), dịch ổ bụng hoặc nước bọt.

8. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lượng mẫu dịch thể (9) nằm trong khoảng từ 1 μ L đến 100 μ L, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 μ L đến 75 μ L.

9. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó khoảng thời gian từ lúc cung cấp mẫu dịch thể (9) qua cửa nạp mẫu (4) để đánh giá sự tổn thương tế bào do tình trạng thiếu oxy gây ra tới lúc có thể phát hiện trực quan được là dưới 5 phút, tốt hơn là dưới 2 phút, tốt hơn nữa là dưới 1 phút.

10. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tổng lượng chất đánh dấu tiên lượng trong mẫu dịch thể (9) được ước tính bằng cách so sánh với hệ tham chiếu tiêu chuẩn gia tăng độ đậm màu, trong đó sự không màu hoặc có màu với độ đậm thấp là tương ứng với nồng độ thấp của chất đánh dấu và màu với độ đậm cao hơn là tương ứng với nồng độ cao hơn của chất đánh dấu.

11. Hệ thống thử nghiệm điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dụng cụ dùng một lần (2) có nhiều hơn hai khoang phát hiện trực quan (5A-C) được bố trí trên thẻ, tốt hơn là mỗi khoang này được bố trí cùng với thuốc thử hoá học dưới dạng thành phần thuốc thử.

12. Hệ thống thử nghiệm điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó mỗi khoang trong số hai khoang phát hiện trực quan nêu trên (5A-C) được bố trí cùng với thành phần thuốc thử để phát hiện trực quan trực tiếp một thành phần của

nhóm bao gồm các chất đánh dấu tiên lượng Hb, LDH, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), lactat, creatin kinaza (CK), K, Mg và Ca.

13. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dụng cụ dùng một lần (2) có buồng tiếp nhận (6) nối với cửa nạp mẫu (4), buồng tiếp nhận này (6) tạo thành khoang và bề mặt chung dùng cho bộ gom mẫu (7).

14. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó cửa nạp mẫu (4) có bộ gom mẫu mao quản đã được tích hợp (7) dùng để gom mẫu dịch thể của động vật có vú.

15. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó thuốc thử hoá học là thành phần thuốc thử dưới dạng thuốc thử hoá học khô hoặc thuốc thử hoá học ướt.

16. Hệ thống thử nghiệm theo điểm 15, trong đó thành phần thuốc thử được bố trí để xác định LDH là hợp chất tetrazoli, tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm nitro tetrazoli xanh (NBT), 1-(p-iodofenyl)-5-(p-nitrofenyl)-3-fenylformazan (INT) và 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxypheyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli (MTS).

17. Hệ thống thử nghiệm theo điểm 15 hoặc 16, trong đó thành phần thuốc thử là chất trung gian dưới dạng phenazin metosulphat (PMS) hoặc 1-metoxi-5-metylphenazini metylsulphat (mPMS).

18. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 17, trong đó thành phần thuốc thử còn là lactat và NAD^+ .

19. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên trong đó độ pH bên trong các khoang phát hiện (5A-C) nằm trong khoảng từ 8 đến 11, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 8,8 đến 9,8.

20. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 18, trong đó thành phần thuốc thử được bố trí để xác định LDH trong chất đệm là N-metyl-D-glucamin.

21. Hệ thống thử nghiệm theo điểm 15 hoặc 20, trong đó độ pH bên trong các khoang phát hiện (5A-C) nằm trong khoảng từ 9 đến 11, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 9,5 đến 10,5, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 9,8 đến 10,2.

22. Hệ thống thử nghiệm theo điểm 15, trong đó thành phần thuốc thử được bố trí để xác định Hb, là hợp chất benziđin tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm tetrametylbenziđin (TMB) và 3,3'-diaminobenziđin (DAB).

23. Hệ thống thử nghiệm theo điểm 22, trong đó thành phần thuốc thử là chất nền peroxit, tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm hydro peroxit, và tert-butylhydroperoxid (T-hydro).

24. Hệ thống thử nghiệm theo điểm 22 hoặc 23, trong đó độ pH bên trong khoang phát hiện (5A) để xác định Hb nằm trong khoảng từ 3 đến 7, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5.

25. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dụng cụ dùng một lần (2) có khoang (8) có chất dùng phản ứng để dùng phản ứng giữa chất đánh dấu tiên lượng và thành phần thuốc thử sau một khoảng thời gian định trước.

26. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, bao gồm cơ cấu (14) để tạo ra áp suất âm bên trong buồng gom (32) nhằm đẩy huyết tương từ mẫu dịch thể đi qua bộ phận tách nêu trên (3) và đi vào ít nhất hai khoang phát hiện (5A-B).

27. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dụng cụ dùng một lần (2) có thể cầm tay được và có chiều dài (1) nằm trong khoảng từ 3 cm đến 15cm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5cm đến 10cm, chiều rộng (W) nằm trong khoảng từ 0,5cm đến 5cm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2cm đến 4cm và chiều dày (d) nằm trong khoảng từ 0,1cm đến 3cm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,3cm đến 0,7cm.

28. Hệ thống thử nghiệm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dụng cụ dùng một lần (2) có trọng lượng nằm trong khoảng từ 5g đến 50g.

Fig. 1A

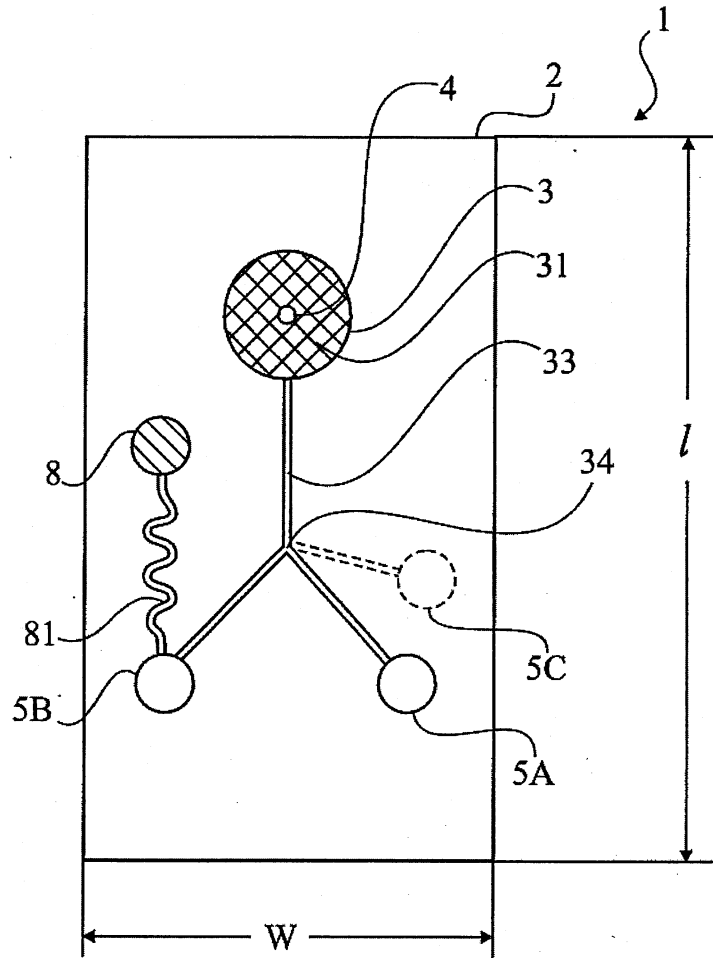


Fig. 1B

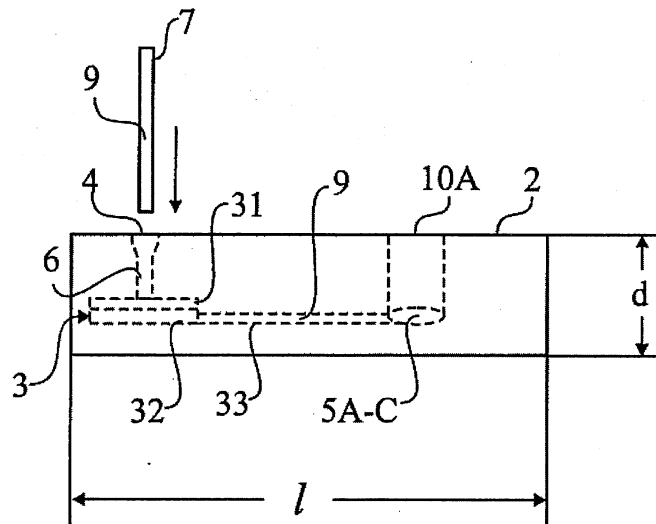


Fig. 1C

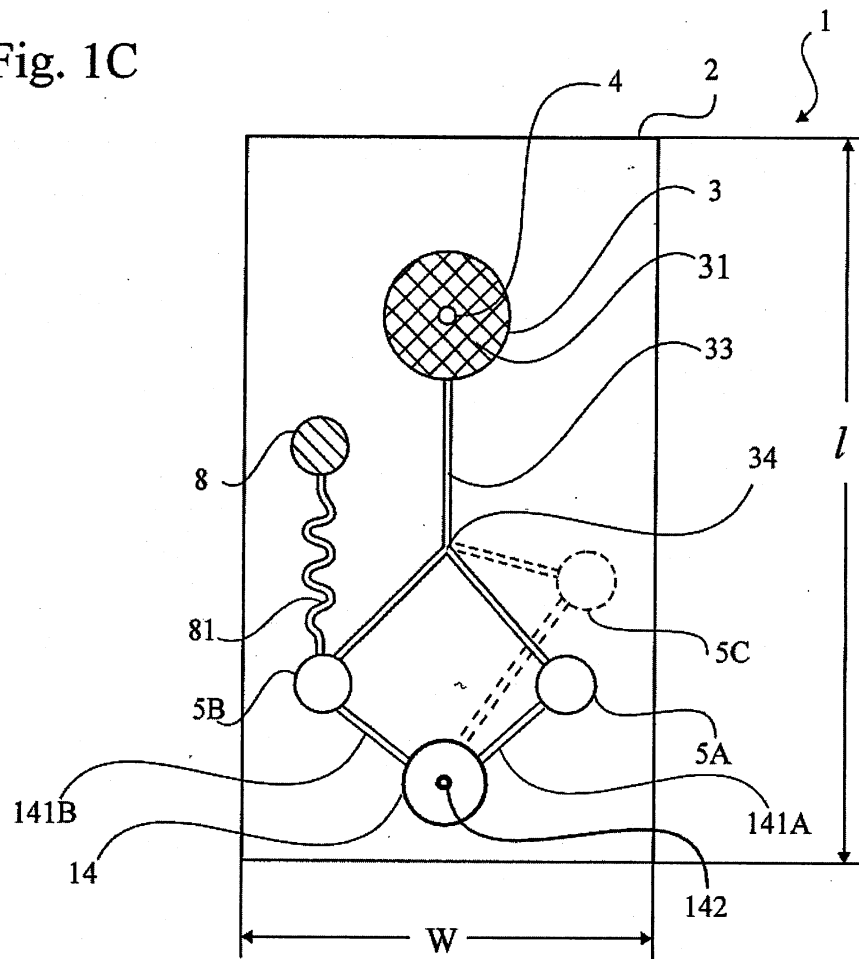


Fig. 2A

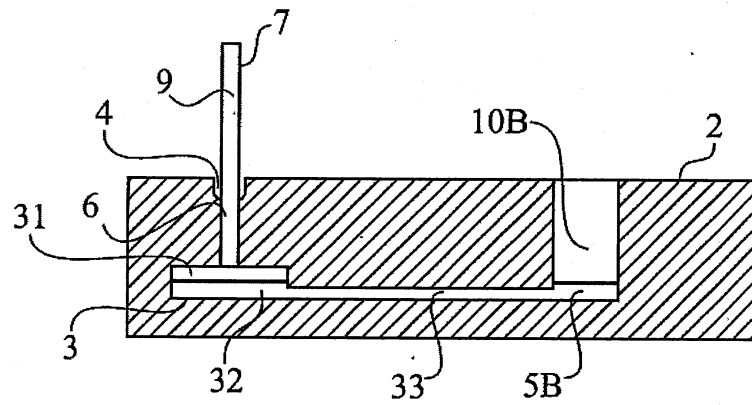
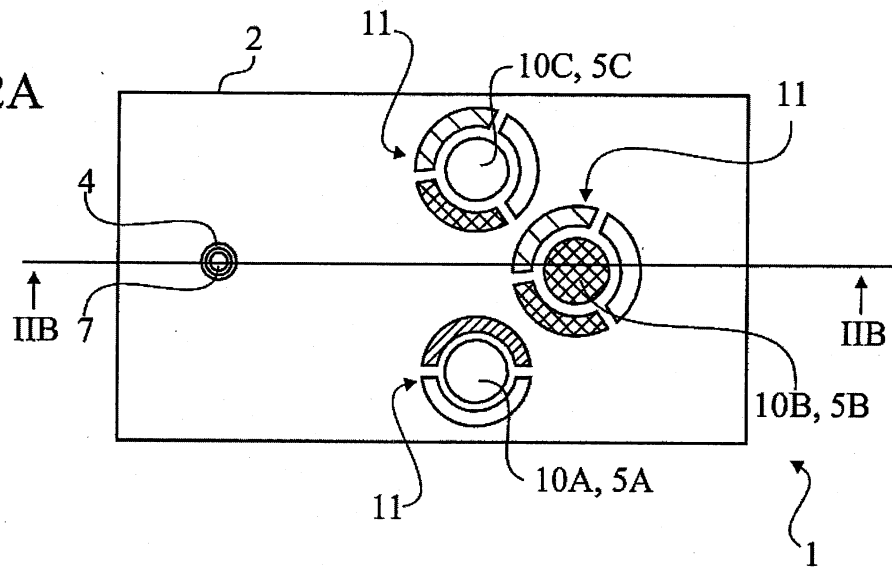


Fig. 2B

Fig. 3

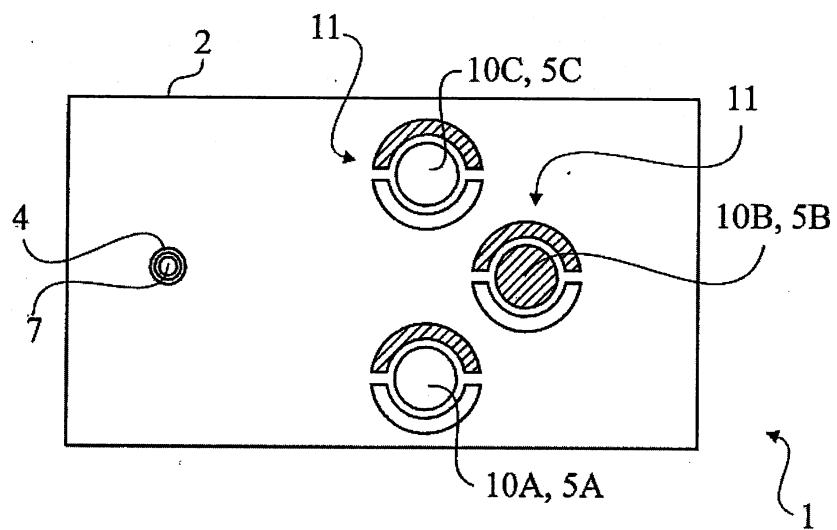


Fig. 4A

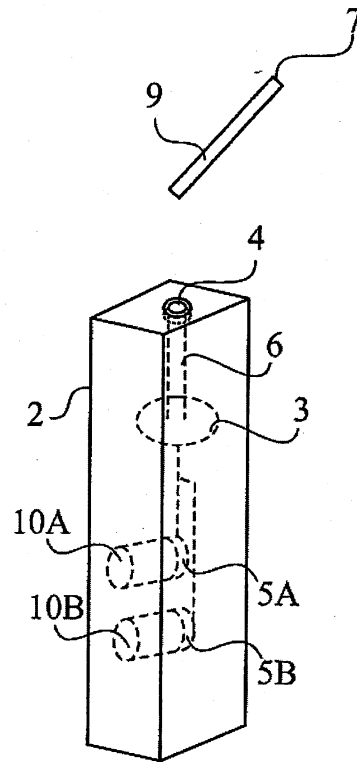


Fig. 4B

