



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11) 
2-0002058

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00139

(22) 27.04.2018

(45) 25.07.2019 376

(43) 25.07.2018 364

(73) **NGUYỄN THỊ TRANG (VN)**

Nhà CT2C, khu đô thị mới Nghĩa Đô, ngõ 106, Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Trang (VN), Phan Văn Hưởng (VN), Bùi Bích Mai (VN), Vũ Tố Giang (VN), Trần Thị Hồng Nhung (VN)

(54) **QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG NỒNG ĐỘ FRUCTOZA TRONG TINH DỊCH
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SO MÀU**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch bằng phương pháp so màu, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
a) điều chế dung dịch resorcinol; b) xây dựng hàm hiệu chuẩn; c) chuẩn bị mẫu;
d) đo mật độ quang với bước sóng 530nm, với đối chứng thay cho tinh dịch là 100μl TCA, và e) xác định hàm lượng fructoza theo hệ số đã được xây dựng bởi hàm hiệu chuẩn bằng công thức:

$$C \text{ fructoza} = E(OD) \times C(h)/E(h)$$

Trong đó, E(OD) là mật độ quang học của fructoza mẫu ở bước sóng 530nm, C(h) là nồng độ fructoza tiêu chuẩn khi pha loãng trong hàm hiệu chuẩn, E(h) là mật độ quang học của fructoza tiêu chuẩn ở hàm hiệu chuẩn. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép đánh giá nồng độ fructoza trong tinh dịch trong vòng 24 giờ. Quy trình theo giải pháp hữu ích giúp định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch giúp chẩn đoán và điều trị vô sinh ở nam giới, đặc biệt là các trường hợp vô sinh do tắc nghẽn đường dẫn tinh và lựa chọn phương pháp hỗ trợ sinh sản.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực di truyền ứng dụng trong y học, cụ thể là đề cập đến quy trình định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch bằng phương pháp so màu để ứng dụng trong chẩn đoán nguyên nhân vô sinh nam và lựa chọn phương pháp hỗ trợ sinh sản thích hợp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Vô sinh hiện nay là một vấn đề sức khỏe sinh sản đang gặp phải với tỷ lệ ngày càng cao và nhận được nhiều sự quan tâm của xã hội. Theo tổ chức Y tế Thế giới, 10% - 15% các cặp vợ chồng trong độ tuổi sinh sản bị vô sinh, trong đó có khoảng 30% - 40% nguyên nhân do nam giới, 40% do nữ giới, 10% do cả nam và nữ, 10% không rõ nguyên nhân. Như vậy, nguyên nhân vô sinh từ nam và nữ gần như tương đương nhau.

Có rất nhiều nguyên nhân gây ra vô sinh nam, do đó việc chẩn đoán nguyên nhân là vô cùng quan trọng, ảnh hưởng đến hướng điều trị và kết quả điều trị.

Tinh dịch đồ là một xét nghiệm thường quy, cho phép xác định được các chỉ số như số lượng, mật độ, tỉ lệ sống, tỉ lệ di động, hình thái của tinh trùng. Tuy nhiên, chỉ với các chỉ số này thì chưa đủ để chẩn đoán nguyên nhân vô sinh ở nam giới. Do vậy, ngay từ đầu thế kỉ XX, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về các yếu tố sinh hóa trong tinh dịch. Trong đó, xét nghiệm định lượng fructoza trong tinh dịch đóng vai trò quan trọng vì fructoza là nguồn cung cấp năng lượng chính cho mọi hoạt động sống của tinh trùng.

Vai trò của nồng độ fructoza trong tinh dịch đối với tỉ lệ sống và độ di động của tinh trùng rất quan trọng. Năng lượng từ fructoza là cơ sở dinh dưỡng chủ yếu cho tinh trùng, đảm bảo sự sinh sản, phát triển từ đó ảnh hưởng đến tỉ lệ

sống và khả năng di động của tinh trùng. Hoạt lực của tinh trùng liên quan chặt chẽ đến nồng độ fructoza trong tinh dịch. Được hình thành trong túi tinh và bài tiết qua các ống dẫn tinh nên fructoza được coi là chất sinh hóa phản ánh trung thực chức năng của các thành phần này. Theo WHO 2010, fructoza trong tinh dịch thấp là đặc trưng của tình trạng tắc nghẽn hệ thống ống dẫn tinh gặp trong bất sản ống dẫn tinh, bất sản túi tinh, thiếu hụt androgen hay xuất tinh ngược dòng.

Để chẩn đoán nguyên nhân vô sinh ở nam giới, ngoài xét nghiệm tinh dịch đồ, thì xét nghiệm định lượng nồng độ fructoza cần được chỉ định nhằm cung cấp những thông tin về chất lượng tinh dịch, tình trạng của túi tinh và đường dẫn tinh từ đó chẩn đoán nguyên nhân vô sinh, đặc biệt là các trường hợp vô sinh do tắc nghẽn đường dẫn tinh nhằm điều trị cũng như cải thiện tỉ lệ thành công trong hỗ trợ sinh sản. Trên thế giới hiện nay có một số kỹ thuật được sử dụng để định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch như phương pháp sắc ký lỏng cao áp, phương pháp enzym, phương pháp so màu sử dụng indole, hay resorsinol, .v.v.. Cụ thể như:

Phương pháp enzym

Nguyên lí hoạt động: Gồm sorbitol dehydrogenaza và sự oxy hóa đồng thời của NADH. Quá trình oxy hóa NADH tỉ lệ thuận với nồng độ fructoza trong tinh dịch. Nghiên cứu này khảo sát mật độ quang ở mức sóng là 340 nm tại 2 thời điểm 3 phút và 23 phút thì xác định được nồng độ fructoza thông qua mức chênh lệch mật độ quang. Ưu điểm của phương pháp này khi so sánh với phương pháp so màu sử dụng resorcinol là phương pháp enzym có hệ số tương quan lên đến 0,96 với độ tin cậy 95%. Nhược điểm của phương pháp này là khá phức tạp và giá thành cao.

Phương pháp so màu

Nguyên lí hoạt động: tinh dịch có chứa fructoza trong môi trường axit mạnh (thường dùng HCl) và được đun nóng sẽ chuyển đổi thành fufurol. Chất

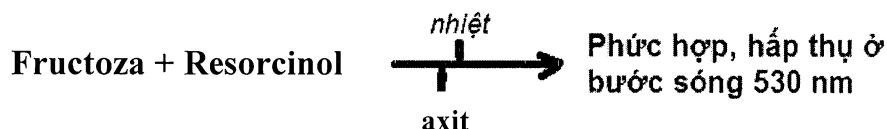
này phản ứng với các chất chỉ thị màu như resorcinol hay indole. Sau đó sử dụng phương pháp so màu và đo mật độ quang (OD) để xác định nồng độ fructoza trong tinh dịch. Một số chất màu khác có thể được sử dụng là tryptamin, anilin, tuy nhiên các chất màu này không phổ biến trong phòng thí nghiệm.

Phương pháp so màu bằng indole

Nguyên lí hoạt động: Phương pháp này được Karvonen và Malm mô tả năm 1955. fructoza trong môi trường axit mạnh và ở nhiệt độ 37°C, phản ứng với indole và làm đổi màu dung dịch thành màu vàng cam. Phức chất này được hấp thụ ở bước sóng từ 470-492 nm. Ưu điểm của phương pháp này là quy trình thực hiện đơn giản, cho kết quả nhanh chóng. Nhược điểm của phương pháp này là không thể đo chính xác khi nồng độ fructoza trong tinh dịch nhỏ hơn 0,5g/l, và giá thành đắt gây khó khăn trong phổ biến xét nghiệm một cách rộng rãi.

Phương pháp so màu bằng resorcinol

Nguyên lí hoạt động: Từ những năm 1934, Roe và cộng sự đã đưa ra phương pháp so màu dùng chất chỉ thị là resorcinol để định lượng fructoza trong huyết thanh, vì vậy phương pháp này còn gọi là phương pháp ROE. Phương pháp này cũng được Mann mô tả lại trong nghiên cứu năm 1964. Theo đó, fructoza phản ứng trong môi trường axit mạnh tạo ra 5 – hydroxyl methyl furfural, chất này khi gặp chất chỉ thị màu là resorcin tạo thành phức có màu đỏ tươi. Độ đậm màu tỉ lệ thuận với nồng độ fructoza trong tinh dịch. Nồng độ fructoza trong tinh dịch định lượng theo phương pháp ROE, kết hợp tiêu chuẩn WHO và nhiều nghiên cứu trên thế giới đã đưa ra kết luận nồng độ fructoza được coi là bình thường khi trong khoảng 1,3 - 4,0 g/l. Ưu điểm của phương pháp này là quy trình thực hiện một cách đơn giản, không cần hóa chất, dụng cụ hay thiết bị gì đặc biệt, phù hợp trong việc dễ dàng phổ biến đại trà, dễ thực hiện trên số lượng mẫu lớn, độ đặc hiệu của phương pháp cao.



Một nghiên cứu năm 2001 sử dụng phương pháp ROE chứng minh được rằng nồng độ fructoza ảnh hưởng đến chức năng của túi tinh, đồng thời, sự tăng nồng độ fructoza trong tinh dịch ảnh hưởng rõ nét đến độ di động của tinh trùng. Do đó, fructoza là giá trị hữu dụng trong đánh giá chức năng sinh sản nam giới.

Lu và các cộng sự (2007) đã tiến hành nghiên cứu sự ổn định của nồng độ fructoza trong tinh dịch bằng phương pháp ROE và đo mật độ quang tại bước sóng 490 nm. Kết quả cho thấy nồng độ fructoza trong tinh dịch duy trì ổn định, không có sự chênh lệch mang ý nghĩa thống kê tại thời điểm 0, 2, 4, 6 giờ sau li tâm tinh dịch.

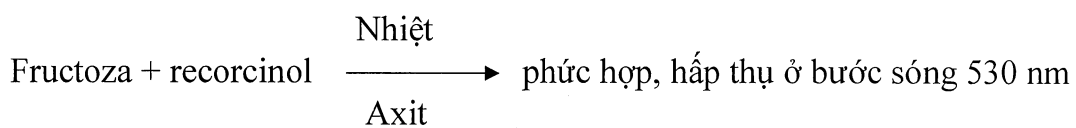
Nồng độ fructoza trong tinh dịch phản ánh sự khác biệt rõ ràng về tổng số cũng như mật độ tinh trùng ở những bệnh nhân vô sinh nam so với những người bình thường là kết luận đã được chỉ ra trong một nghiên cứu gần đây.

Định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch bằng phương pháp resorsinol (ROE) là một phương pháp phổ biến được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch do có nhiều ưu điểm: hóa chất, quy trình tiến hành đơn giản, cho kết quả nhanh chóng, dễ thực hiện trên số lượng mẫu lớn, độ đặc hiệu của phương pháp cao... Tuy nhiên ở Việt Nam xét nghiệm này còn chưa được phổ biến và các nghiên cứu về nồng độ fructoza trong tinh dịch còn ít.

Vì sự quan trọng và tính cấp thiết đã nêu trên, nên cần phải có một quy trình định lượng nồng độ fructoza theo phương pháp so màu để đưa vào thường quy chẩn đoán nguyên nhân vô sinh dựa vào nồng độ fructoza của tinh dịch.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm khắc phục tình trạng nêu trên. Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích này đề xuất quy trình định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch người. Tinh dịch chứa fructoza phản ứng trong môi trường axit mạnh tạo ra 5 – hydroxyl methyl furfural, chất này khi gặp chất chỉ thị màu là resorcinol tạo thành phức có màu đỏ tươi. Độ đậm màu tỉ lệ thuận với nồng độ fructoza trong tinh dịch. Các tác giả của giải pháp hữu ích nhận thấy rằng, nồng độ fructoza trong tinh dịch định lượng theo phương pháp này được coi là bình thường khi trong khoảng 1,3 – 4,0 g/l.



Quy trình định lượng fructoza trong tinh dịch theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước sau:

điều chế dung dịch resorcinol 0,1% bằng cách pha resorcin với etanol theo tỷ lệ 0,1g resorcin trong 100 ml etanol 95°;

xây dựng hàm hiệu chuẩn cho các dung dịch resorcinol sau mỗi lần pha, với nồng độ fructoza bình thường từ 1,3 – 4,0 g/l nên sẽ chọn 8 mẫu đôi một với 4 ngưỡng hàm hiệu chuẩn là 0,5; 1; 2 và 4 g/l, cùng với một mẫu chứng, sau đó tiến hành xác định mật độ quang học tương ứng với các ngưỡng nồng độ fructoza tiêu chuẩn;

chuẩn bị mẫu bằng cách lấy mẫu tinh dịch rồi ly tâm tinh dịch ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 15 phút để thu được dịch nổi, loại bỏ protein trong tinh dịch bằng cách cho 100 µl dịch nổi này vào 400 µl TCA 10%, trộn đều, ly tâm với tần số 1500 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ phần protein trong tinh dịch, sau đó cho tinh dịch đã được loại bỏ protein vào dung dịch chứa 2,5 ml dung dịch HCl 30% và 250 µl dung dịch resorcinol 0,1% đã được điều chế ở bước trên, ủ ở nhiệt độ 80 – 85°C trong 5 phút;

đo mật độ quang (OD) với bước sóng 530nm, với đối chứng, thay cho tinh dịch là 100 µl TCA;

xác định hàm lượng fructoza theo hệ số đã được xây dựng bởi hàm hiệu chuẩn bằng công thức sau:

$$C \text{ fructoza} = E (OD) \times C(h)/E(h)$$

trong đó, E (OD) là mật độ quang học của fructoza mẫu ở bước sóng 530nm,

C (h) là nồng độ fructoza tiêu chuẩn khi pha loãng trong hàm hiệu chuẩn,

E (h) là mật độ quang học của fructoza tiêu chuẩn ở hàm hiệu chuẩn,

C(h)/E(h) là hệ số a xây dựng được từ hàm hiệu chuẩn.

Nồng độ fructoza trong tinh dịch theo phương pháp này được xem là bình thường khi đạt 1,3 – 4,0 g/l.

Mô tả văn tắt hình vẽ kèm theo

Hình 1: Biểu đồ đường chuẩn nồng độ fructoza theo OD ở bước sóng 530nm

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) điều chế dung dịch resorcinol; b) xây dựng hàm hiệu chuẩn; c) chuẩn bị mẫu; d) đo mật độ quang; và e) định lượng nồng độ fructoza.

Trừ khi có quy định khác, các hóa chất được sử dụng trong giải pháp hữu ích có thể thu được từ nguồn thương mại, ví dụ TCA (axit tricloacetic), HCl, resorcinol, etanol... đều là các sản phẩm thương mại có thể tìm được trên thị trường.

a) điều chế dung dịch resorcinol

Đây là điểm khác biệt giữa quy trình theo giải pháp hữu ích so với các quy trình đã biết trên thế giới. Trên thế giới, hoá chất để tiến hành xét nghiệm định lượng fructoza bằng phương pháp ROE thường được pha sẵn thành dung dịch

resorsinol để sử dụng luôn. Dung dịch này khó bảo quản, vận chuyển. Ở đây, các tác giả giải pháp hữu ích tiến hành pha dung dịch resorcinol 0,1% bằng resorcinol 0,1g trong 100 ml etanol 95°. Mặt khác, trong quá trình pha hoá chất không thể tránh khỏi các sai số. Tuy nhiên, trong phương pháp định lượng fructoza này, hàm hiệu chuẩn được xây dựng đối với các hóa chất sau mỗi lần pha. Khi sử dụng hết một trong các hóa chất thì cần xây dựng lại hàm hiệu chuẩn. Vì vậy, việc pha nhiều hoá chất một lúc, thành 2 phần riêng để bảo quản lâu dài vừa giúp hạn chế các sai số, vừa giúp sử dụng hoá chất một cách hiệu quả, tiết kiệm.

Mặt khác resorcinol và etanol đều là các loại hóa chất rẻ tiền, dễ mua bằng nguồn thương mại, bảo đảm tính bền vững của xét nghiệm và tiết kiệm chi phí cho bệnh nhân.

b) xây dựng hàm hiệu chuẩn.

Hàm hiệu chuẩn được xây dựng đối với các hóa chất sau mỗi lần pha. Khi sử dụng hết một trong các hóa chất thì cần xây dựng lại hàm hiệu chuẩn. Vì nồng độ fructoza bình thường theo phương pháp ROE nằm trong khoảng từ 1,3 – 4,0 g/l nên sẽ chọn 8 mẫu đôi một với 4 ngưỡng hàm hiệu chuẩn là 0,5; 1; 2 và 4 g/l, cùng với một mẫu chứng. Sau đó tiến hành xác định mật độ quang học tương ứng với các ngưỡng nồng độ fructoza tiêu chuẩn theo phương pháp ROE.

Từ kết quả thu được, xây dựng hàm hiệu chuẩn $y = ax$ và hệ số tương quan R. Trong đó, y là nồng độ fructoza hiệu chuẩn, x là mật độ quang đo được.

c) chuẩn bị mẫu

Trong bước chuẩn bị mẫu, mẫu được thu nhận là tinh dịch được lấy từ phòng xét nghiệm tinh dịch đồ. Mẫu là một lượng tinh dịch từ 100-200 μ l được bảo quản ở nhiệt độ thường trong vòng 2 tiếng và 4°C trong vòng 24 giờ. Tinh dịch cần được lấy bằng phương pháp thủ dâm với điều kiện trong vòng 3-5 ngày không xuất tinh. Việc lấy mẫu tinh dịch cần được thực hiện trong phòng lấy mẫu

và cho trực tiếp vào ống đảm bảo điều kiện không lây nhiễm ra môi trường ngoài.

Trường hợp lượng tinh trùng từ 2-5 triệu/ml tinh dịch, tiến hành ly tâm ở tần số 1500 vòng/phút loại bỏ dịch nổi, lấy cặn chứa tinh dịch lắng đọng để thao tác. Sau đó, loại bỏ protein trong tinh dịch bằng cách sử dụng dung dịch TCA 10% để làm biến tính protein. Đây là bước rất quan trọng trong quy trình kỹ thuật. Vì bản chất tinh dịch có chứa rất nhiều protein, điều này sẽ làm ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm định lượng fructoza. Làm biến tính protein từ đó loại bỏ bớt protein trong tinh dịch sau khi ly tâm, giúp hạn chế sai số, để kết quả thí nghiệm được chính xác hơn.

Ở bước này lưu ý rằng với các mẫu tinh dịch có mật độ tinh trùng cao (≥ 200 triệu/ml), chúng ta cần pha loãng với nước muối sinh lý với tỉ lệ 1:100. Điều này giúp chúng ta có thể đo mật độ quang trong ngưỡng của máy đo mật độ quang học.

d) Đo mật độ quang

Tinh dịch chứa fructoza phản ứng trong môi trường axit mạnh tạo ra 5 – hydroxyl methyl furfural, chất này khi gặp chất chỉ thị màu là resorcinol tạo thành phức có màu đỏ tươi. Độ đậm màu tỉ lệ thuận với nồng độ fructoza trong tinh dịch. Vì phức chất được tạo ra có màu sắc ổn định trong 2-3 giờ và độ đậm màu của hỗn hợp tỉ lệ thuận với nồng độ fructoza trong tinh dịch, nên đo mật độ quang giúp định lượng được hàm lượng fructoza trong tinh dịch của nam giới.

e) xác định nồng độ fructoza

Trong bước đánh giá kết quả, tính nồng độ fructoza theo công thức:

$$C \text{ fructoza} = E(OD) \times C(h)/E(h)$$

Trong đó: E (OD) là mật độ quang học của fructoza mẫu ở bước sóng 530nm.

C (h) là nồng độ fructoza tiêu chuẩn khi pha loãng trong hàm hiệu chuẩn.

$E(h)$ là mật độ quang học của fructoza tiêu chuẩn ở hàm hiệu chuẩn.

$C(h)/E(h)$ là hệ số a xây dựng được từ hàm hiệu chuẩn.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch bằng phương pháp so màu theo giải pháp hữu ích

Sau khi nhận mẫu tinh dịch từ phòng làm tinh dịch đồ, các tác giả giải pháp hữu ích tiến hành định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch. Mọi bước thực hiện đều được tiến hành nghiêm ngặt. 300 mẫu tinh dịch được lựa chọn từ 300 bệnh nhân có độ tuổi trung bình là 31,1. Sau khi phân tích kết quả tinh dịch đồ theo tiêu chuẩn WHO 2010, các tác giả giải pháp hữu ích tiến hành định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch của 300 mẫu nghiên cứu của 3 nhóm. Mỗi nhóm nghiên cứu gồm 100 mẫu tinh dịch (nhóm I có mật độ tinh trùng ≥ 15 triệu/ml; nhóm II có mật độ tinh trùng < 15 triệu/ml; nhóm III không có tinh trùng trong tinh dịch). Quy trình định lượng fructoza trong tinh dịch theo giải pháp hữu ích được thực hiện cụ thể như sau:

điều chế dung dịch resorcinol 0,1% bằng cách pha resorcin với etanol theo tỷ lệ 0,1g resorcin trong 100 ml etanol 95°;

Hàm hiệu chuẩn được xây dựng với ngưỡng nồng độ fructoza chuẩn lần lượt là 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 g/l, các tác giả giải pháp hữu ích đo mật độ OD tương ứng với mỗi ngưỡng nồng độ fructoza chuẩn theo quy trình xét nghiệm được hoàn thiện và dựng được đường chuẩn như được thể hiện trên Hình 1. Hàm hiệu chuẩn được các tác giả giải pháp hữu ích xây dựng được trong nghiên cứu này là $y = 1,2797x$ với $R=0,99$, trong đó: y là nồng độ fructoza trong tinh dịch, x là mật độ OD đo được.

Chuẩn bị mẫu bằng cách dùng pipet lấy 100 μ l mẫu tinh dịch cho vào eppendorf, sau đó ly tâm ở 1500 vòng/phút trong 10 phút nhằm lắng tể bào tinh trùng xuống đáy và chỉ lấy lớp tinh dịch chứa fructoza ở trên để làm xét nghiệm, vì lớp tinh trùng không sử dụng trong xét nghiệm. Sau đó, dùng pipet lấy

100 µl dịch nổi sau ly tâm thu được ở công đoạn trên cho vào ống nghiệm khác có chứa 2,5 ml dung dịch HCl 30% và 250 µl dung dịch resorcinol 0,1%. Ủ ở nhiệt độ 80 – 85°C trong 5 phút. Fructoza phản ứng với chất chỉ thị màu resorcinol trong môi trường axit mạnh HCl và nhiệt độ cao tạo phức hợp màu đỏ tươi. Với mẫu chứng, thay 100µL dịch nổi bằng 100µL nước cất.

Đo mật độ quang bằng cách để nguội mẫu thu được ở bước trên và đo mật độ quang (OD) của phức hợp màu ở bước sóng 530nm, kích thước curvet 1cm. Màu sắc của dung dịch thu được không thay đổi trong vòng 2 – 3 giờ; và

xác định hàm lượng fructoza theo hệ số đã được xây dựng bởi hàm hiệu chuẩn bằng công thức sau:

Nồng độ fructoza trong mẫu tinh dịch xác định bởi công thức:

$$C_{\text{fructoza}} = a \times E(\text{OD})$$

Trong đó: E (OD) là mật độ quang học của phức hợp màu tạo bởi mẫu tinh dịch của bệnh nhân ở bước sóng 530nm.

a là hệ số được xây dựng bởi hàm hiệu chuẩn xây dựng được theo ví dụ này là $a = 1,2797$.

Kết quả định lượng fructoza trong tinh dịch của 300 bệnh nhân như sau:

Độ nhạy và độ đặc hiệu

Bảng 1. Bảng thống kê kết quả định lượng fructoza ở 3 nhóm bệnh nhân

Nồng độ fructoza	Định lượng theo quy trình của giải pháp hữu ích	Định lượng theo quy trình đã biết
Nhóm 1(nhóm chứng)		
Dưới ngưỡng	8	8
Bình thường	92	92
Nhóm 2 (nhóm có 1 số chỉ số TĐĐ bất thường)		
Dưới ngưỡng	17	18
Bình thường	83	82

Nhóm 3 (nhóm có ít hoặc không có tình trùng)		
Dưới ngưỡng	35	34
Bình thường	65	66

Bảng 2. Bảng thống kê các số lượng để tính độ nhạy, độ đặc hiệu

	Dương tính thật	Dương tính giả	Âm tính thật	Âm tính giả
Nhóm 1	92	0	8	0
Nhóm 2	82	1	17	0
Nhóm 3	34	0	65	1
Tổng	208	1	90	1
Độ nhạy	99,52 %			
Độ đặc hiệu	98,90 %			

Như vậy, độ nhạy của bộ xét nghiệm tự pha đạt 99,52% và độ đặc hiệu của quy trình định lượng theo giải pháp hữu ích đạt 98,90%.

Độ chính xác

Độ lặp lại

Bảng 3. Kết quả thực nghiệm độ lặp lại

Lần đo	Nồng độ fructoza chuẩn (mg/mL)	Độ hấp thụ	Nồng độ fructoza đo được (mmol/L)
1	2,5	1,665	2,46
2	2,5	1,682	2,49
3	2,5	1,670	2,47
4	2,5	1,683	2,49
5	2,5	1,637	2,42
6	2,5	1,632	2,42
7	2,5	1,607	2,38
8	2,5	1,642	2,43
9	2,5	1,651	2,44
10	2,5	1,654	2,45
SD	0,034		
CV%	1,407		

Nhận xét: Từ kết quả ở bảng trên, các tác giả giải pháp hữu ích tính được độ lệch chuẩn $SD = 0,034$ và hệ số biến thiên $CV\% = 1,407$. Hệ số biến thiên của quy trình định lượng hàm lượng fructoza theo giải pháp hữu ích nằm trong giới hạn cho phép ($CV\% < 5\%$)

Độ chụm trung gian

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm độ chụm trung gian

Lần thử	Nồng độ fructoza tiêu chuẩn (mg/ml)	Nồng độ fructoza đo được do các KTV khác nhau (mg/mL)		
		KTV 1	KTV 2	KTV 3
1	2,5	2,55	2,45	2,39
2	2,5	2,55	2,48	2,43
3	2,5	2,51	2,58	2,52
4	2,5	2,57	2,65	2,60
5	2,5	2,50	2,56	2,54
6	2,5	2,50	2,56	2,52
7	2,5	2,52	2,59	2,52
8	2,5	2,52	2,59	2,52
9	2,5	2,52	2,50	2,54
10	2,5	2,55	2,52	2,51
SD	0,051			
CV%	2,032			

Nhận xét: Với kết quả thu được từ *bảng trên*, sử dụng công thức tính độ chụm, các tác giả giải pháp hữu ích thu được độ lệch chuẩn là $SD = 0,051$, từ đó tính được hệ số biến thiên là $CV\% = 2,032\%$. Hệ số biến thiên này nằm trong giới hạn cho phép $CV\% < 5\%$.

*Độ đúng**Bảng 5. Kết quả thử nghiệm độ đúng*

Lần đo	Nồng độ fructoza chuẩn (mg/mL)	OD	Nồng độ fructoza đo được (mg/mL)
1	2,5	1,622	2,55
2	2,5	1,625	2,55
3	2,5	1,699	2,51
4	2,5	1,735	2,47
5	2,5	1,689	2,50
6	2,5	1,686	2,50
7	2,5	1,701	2,52
8	2,5	1,705	2,52
9	2,5	1,704	2,52
10	2,5	1,721	2,45

Nhận xét: Với kết quả như trên, các tác giả giải pháp hữu ích tính được $t_{\text{tn}} = 0,906$. Bên cạnh đó, thông qua tra bảng có $t_c = 2,262$

$t_{\text{tn}} < t_c$: đạt được tiêu chuẩn kiểm nghiệm.

So sánh nồng độ fructoza đo được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích và quy trình đã biết trên thị trường

So sánh tương đương hai bộ xét nghiệm

Bảng 6. Bảng kiểm định hệ số tương quan giữa hai quy trình

N		300
Hệ số tương quan Pearson		0,990
p		< 0,001
Khoảng tin cậy 95 %	Giới hạn trên	0,999
	Giới hạn dưới	0,973

Nhận xét: Thử nghiệm Pearson cho kết quả có sự tương quan mạnh giữa nồng độ fructoza đo được giữa hai phương pháp tự pha và bộ kit thương mại đạt chuẩn với $r = 0,990$, $p < 0,001$.

Bảng 7. Bảng kiểm định T-test của chênh lệch giữa hai quy trình

t	p	Trung bình của sự khác biệt	Khoảng tin cậy 95%	
			Giới hạn dưới	Giới hạn trên
-2,117	0,035	-0,029	-0,056	-0,002

Nhận xét: Trị số trung bình của chênh lệch giữa hai quy trình đo là -0,29 và không khác biệt với 0 với $p = 0,035 < 0,05$, nghĩa là có sự tương hợp giữa hai quy trình đo với độ tin cậy 95%. Khác biệt trung bình giữa hai quy trình là rất nhỏ (0,0116), gần bằng 0. Đa số trường hợp có sai số nằm trong giới hạn $\pm 1,96$ độ lệch chuẩn. Do đó hai quy trình có giá trị tương đương như nhau trong định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Như mô tả chi tiết ở trên, quy trình theo giải pháp hữu ích được tiến hành đơn giản và dễ dàng sử dụng cho việc xác định nồng độ fructoza trong tinh dịch. Quy trình theo giải pháp hữu ích này có thể sử dụng ở các phòng thí nghiệm chuyên về sinh sản mà không cần các trang thiết bị phức tạp. Ngoài ra đây là phương pháp xét nghiệm linh hoạt cho phép định lượng nồng độ fructoza trong vòng 24 giờ.

Trong quy trình của các tác giả giải pháp hữu ích dung dịch resorcinol 0,1% được pha bằng resorcin 0,1g trong 100 ml etanol 95° khi tác dụng với fructoza trong tinh dịch tạo phức chất có màu sắc ổn định trong vòng 2 giờ. Đây là điểm khác biệt giữa quy trình theo giải pháp hữu ích so với các quy trình đã biết trên thế giới. Trên thế giới, hoá chất để tiến hành xét nghiệm định lượng fructoza bằng phương pháp ROE thường được pha sẵn thành dung dịch

resorcinol để sử dụng luôn. Dung dịch này khó bảo quản và vận chuyển. Mặt khác, trong quá trình pha hoá chất không thể tránh khỏi các sai số. Tuy nhiên, phương pháp định lượng fructoza này hàm hiệu chuẩn được xây dựng đối với các hóa chất sau mỗi lần pha. Khi sử dụng hết một trong các hóa chất thì cần xây dựng lại hàm hiệu chuẩn. Vì vậy, việc pha nhiều hoá chất một lúc, thành 2 phần riêng để bảo quản lâu dài vừa giúp chúng ta hạn chế các sai số, vừa giúp sử dụng hoá chất một cách hiệu quả, tiết kiệm.

Mặt khác resorcin và etanol đều là các loại hóa chất rẻ tiền, dễ mua bằng nguồn thương mại, bảo đảm tính bền vững của xét nghiệm và tiết kiệm chi phí cho bệnh nhân.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình định lượng nồng độ fructoza trong tinh dịch bằng phương pháp so màu, quy trình này bao gồm các bước sau:

điều chế dung dịch resorcinol 0,1% bằng cách pha resorcin với etanol theo tỷ lệ 0,1g resorcin trong 100 ml etanol 95°;

xây dựng hàm hiệu chuẩn cho các dung dịch resorcinol sau mỗi lần pha, với nồng độ fructoza bình thường nằm trong khoảng từ 1,3 – 4,0 g/l nên sẽ chọn 8 mẫu đôi một với 4 ngưỡng hàm hiệu chuẩn là 0,5; 1; 2 và 4 g/l, cùng với một mẫu chứng, sau đó tiến hành xác định mật độ quang học tương ứng với các ngưỡng nồng độ fructoza tiêu chuẩn;

chuẩn bị mẫu bằng cách lấy mẫu tinh dịch rồi ly tâm tinh dịch ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 15 phút để thu được dịch nổi, loại bỏ protein trong tinh dịch bằng cách cho 100 µl dịch nổi này vào 400 µl axit triclo acetic (TCA) 10%, trộn đều, ly tâm với tần số 1500 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ phần protein trong tinh dịch, sau đó cho tinh dịch đã được loại bỏ protein vào dung dịch chứa 2,5 ml dung dịch HCl 30% và 250 µl dung dịch resorcinol 0,1% đã được điều chế ở bước trên, ủ ở nhiệt độ 80 – 85°C trong 5 phút;

đo mật độ quang (OD) với bước sóng 530nm, với đôi chứng, thay cho tinh dịch là 100 µl TCA; và

xác định hàm lượng fructoza theo hệ số đã được xây dựng bởi hàm hiệu chuẩn bằng công thức sau:

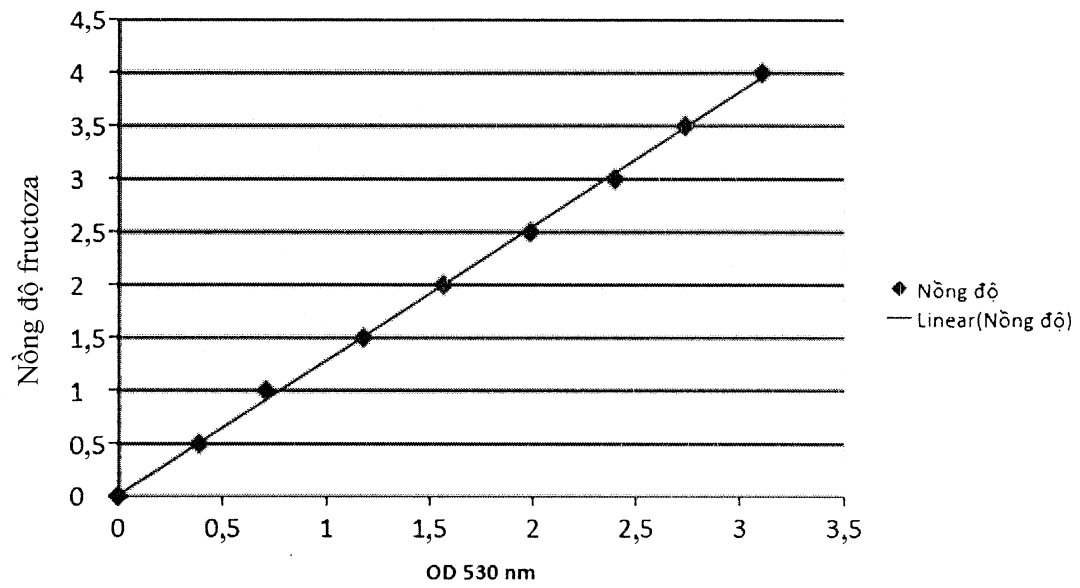
$$C \text{ fructoza} = E \text{ (OD)} \times C(h)/E(h)$$

trong đó, E (OD) là mật độ quang học của fructoza mẫu ở bước sóng 530nm,

C (h) là nồng độ fructoza tiêu chuẩn khi pha loãng trong hàm hiệu chuẩn,

E (h) là mật độ quang học của fructoza tiêu chuẩn ở hàm hiệu chuẩn,

C(h)/E(h) là hệ số a xây dựng được từ hàm hiệu chuẩn.



Hình 1