(19) กรมทรัพย์สินทางปัญญา
กระทรวงพาณิชย์
เลขที่อนุสิทธิบัตร 10727

(11) เลขที่ประกาศโฆษณา 10727
(43) วันประกาศโฆษณา 12 พฤศจิกายน 2558
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร 12 พฤศจิกายน 2558

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

(21) เลขที่คำขอ 1003000276
(22) วันที่ยื่นคำขอ 26 มีนาคม 2553

(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl.10
G01N 33/00

(31) เลขที่คำขอที่ยื่นครั้งแรก
-
(32) วันที่ยื่นคำขอครั้งแรก
-
(33) ประเทศที่ยื่นคำขอครั้งแรก
-

(71) ผู้ขอรับสิทธิบัตร
มหาวิทยาลัยมหิดล
(72) ผู้ประดิษฐ์
นายแพทย์ธีรพงษ์ กระแจะจันทร์ และคณะ
(74) ตัวแทน
นางสาวพลอยพรรณ จิตรแจ้ง
อยู่ที่ สถาบันวิวัฒน์เทคโนโลยีและนวัตกรรมแห่งมหาวิทยาลัยมหิดล
เลขที่ 69 อาคารวิทยาลัยการจัดการ มหาวิทยาลัยมหิดล ชั้น 25
ถนนวิภาวดีรังสิต แขวงสามเสนใน เขตพญาไท
กรุงเทพมหานคร 10400

(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ กรรมวิธีในการเตรียมชุดตรวจโรคพิทิโอสิส (Pythiosis) โดยวิธีฮีเมกกลูติเนชั่น(Hemagglutination)

(57) บทสรุปการประดิษฐ์

กรรมวิธีในการเตรียมชุดตรวจโรคพิทิโอสิส (Pythiosis) โดยวิธีฮีเมกกลูติเนชั่น (Hemagglutination) คือการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum* ในเลือดของผู้ป่วย โดยอาศัยหลักการจับกันของแอนติเจนที่เคลือบบนเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum* ที่อยู่ในเลือดผู้ป่วย ทำให้สามารถเห็นการเกาะกลุ่มเรียกว่าการเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เพื่อช่วยในการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพิทิโอสิส (Pythiosis) ซึ่งมีขั้นตอนกรรมวิธีในการเตรียมชุดตรวจโรคพิทิโอสิส (Pythiosis) โดยวิธีฮีเมกกลูติเนชั่น (Hemagglutination) มีขั้นตอนดังนี้ คือ การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* (culture filtrate antigen), การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะเพื่อใช้ในการเคลือบแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* และการเคลือบติดแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* บนเม็ดเลือดแดงแกะ เพื่อใช้ทดแทนกับการตรวจทางอิมมูโนวิทยาที่มีอยู่ สามารถตรวจนอกพื้นที่ห้องปฏิบัติการได้

(11) เลขที่ประกาศโฆษณา 10727

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีในการเตรียมชุดตรวจโรคพิทิโอสิส (Pythiosis) โดยวิธีฮีเมกกลูติเนชั่น (Hemagglutination) ตามข้อถือสิทธินี้ มีขั้นตอนในการเตรียมดังนี้

1.1 การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* (culture filtrate antigen)

- ทำการเพาะเชื้อ *P. insidiosum* และเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ซาเบอรัด เด็กซ์โทรส บรอธ (Sabouraud dextrose broth) เลี้ยงในเครื่องเขย่า เชคเกอร์ อินคูเบเตอร์ (Shaker incubator) 150 รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 9 วัน

- เติม เมอทิโอเลท (Merthiolate) ความเข้มข้นสุดท้าย, 0.02 % น้ำหนัก/ปริมาตร

- นำไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาดเยื่อเลือกผ่าน 0.22 ไมโครเมตร นำส่วนเหลืองใสที่ผ่านเยื่อกรองมาเติม ฟีนิลเมททิลซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ (phenylmethylsulfonyl fluoride) (0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ EDTA (0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

1.2 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะเพื่อใช้ในการเคลือบแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum*

-นำเม็ดเลือดแดงแกะปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 0.9% นอร์มอล ซาไลด์ (normal saline) และผสมเม็ดเลือดแดงแกะ, 0.15 M ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ที่มีค่า pH 7.2 และ 2.5% กลูตาราดีไฮด์ (Glutaraldehyde) ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:12.5:2.5 โดยปริมาตรตามลำดับ เขย่า 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำตาล นำมาปั่นล้างด้วย 0.9% นอร์มอลซาไลด์ (normal saline) จำนวน 3 ครั้ง

1.3 การเคลือบติดแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* บนเม็ดเลือดแดงแกะ มีขั้นตอนดังนี้

-นำแอนติเจนที่ได้แอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมกับเม็ดเลือดแดงแกะที่ได้จากการเตรียมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 M อะซิเตทบัฟเฟอร์ (Acetate buffer) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่มีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.0 เมื่อผสมเข้ากันดีนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที

-นำมาปั่นล้างด้วย 0.9% นอร์มอล ซาไลด์ (normal saline) จำนวน 3 ครั้ง นำส่วนที่ตกตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.5% โบวาย ซีรั่ม อัลบูมิน (bovine serum albumin:BSA) ใน 0.15 M ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 0.25% จะได้เป็น เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีความไว (sensitized sheep red cells) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(ข้อถือสิทธิ 1 ข้อ, รูปเขียน 0 รูป)