

**ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP ELISA ĐỊNH LƯỢNG KIỂM ĐỊNH CÔNG HIỆU
SINH PHẨM ĐIỀU TRỊ IMMUNOHBs CHỨA KHÁNG THỂ
KHÁNG VIÊM GAN SIÊU VI B**

Phạm Văn Hùng và cs

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Tóm tắt

Áp dụng Phương pháp ELISA định lượng kiểm định công hiệu sinh phẩm Immuno-HBs chứa kháng thể kháng viêm gan siêu vi B thông qua việc đánh giá sự phù hợp của quy trình gồm độ tuyến tính, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác và độ mạnh của phương pháp. Các tiêu chí đánh giá cho kết quả đều đạt yêu cầu về (độ tuyến tính; giới hạn định lượng (LOQ); độ đúng; độ chính xác; độ mạnh) đều đạt các tiêu chuẩn chấp thuận và phù hợp có thể ứng dụng phương pháp ELISSA định lượng cho kiểm định công hiệu của sản phẩm Immuno HBs với hàm lượng 180-200 IU/ml.

Từ khóa: Phương pháp ELISA, Immuno-HBs, Công hiệu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Huyết thanh chứa kháng thể đặc hiệu kháng HBs của virus viêm gan B (Immuno-HBs) là một chế phẩm globulin miễn dịch kháng virus viêm gan B có nguồn gốc từ người, sử dụng nhằm tạo miễn dịch thụ động dự phòng nhiễm bệnh viêm gan B cho nhóm đối tượng có nguy cơ cao như trẻ sinh ra từ bà mẹ nhiễm viêm gan B, người suy gan suy thận hoặc người thuộc nhóm “trơ miễn dịch” mà có tiền sử tiếp xúc với virus viêm gan B [1]. Một trong các thử nghiệm quan trọng để kiểm soát chất lượng của dòng chế phẩm Immuno HBs là thử nghiệm công hiệu nhằm xác định hàm lượng kháng thể anti- HBs có hoạt tính trong sản phẩm huyết thanh người chứa kháng thể viêm gan B (Human Hepatitis B immunoglobulin) sử dụng các phương pháp miễn dịch học như miễn dịch gắn men (ELISA) và sử dụng các mẫu chuẩn quốc tế hoặc mẫu chuẩn đã nói chuẩn và thẩm định để định lượng kháng thể (Dược điển Châu Âu, Dược điển Mỹ) [3],[5].

Trong thời gian qua, Khoa Kiểm định sinh phẩm Y tế, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế nhận được yêu cầu kiểm định một số sản phẩm huyết thanh người chứa kháng thể viêm gan B bao gồm Fovepta và ImmunoHBs 180 IU. Hồ sơ chất lượng của 2 sản phẩm này có tiêu chí về hàm lượng kháng thể anti HBs. Đối với Fovepta, nhà sản xuất thực hiện xác định hiệu giá kháng thể anti HBs bằng phương pháp ELISA định lượng sử dụng kit thương mại. Đối với ImmunoHBs 180 IU, nhà sản xuất thực hiện bằng cả 2 phương pháp: ELISA định lượng và điện hóa phát quang. Phương pháp ELISA định lượng là phương pháp nhanh, chính xác và có nhiều ưu điểm khác bao gồm nguồn cung ứng hóa chất sinh phẩm dễ dàng, thời hạn sử dụng sinh phẩm dài, giá thành rẻ, trang thiết bị máy móc sẵn có, thao tác dễ thực hiện. Do đó, chúng tôi lựa chọn phương pháp ELISA định lượng để thực hiện việc xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs trong sản phẩm Immuno HBs 180 IU [4]

Nghiên cứu này thực hiện để nhằm xác định sự phù hợp của kỹ thuật ELISA định lượng và áp dụng kỹ thuật này trong kiểm định chất lượng sản phẩm huyết thanh người chứa kháng thể viêm gan B.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm nghiên cứu: Khoa Kiểm định sinh phẩm Y tế

Thời gian: Từ tháng 4 năm 2021 đến tháng 12 năm 2021

2.2. Vật liệu phục vụ nghiên cứu

2.2.1. Mẫu thử và mẫu chuẩn

Mẫu chuẩn là mẫu chuẩn quốc tế thứ 2 của kháng thể đặc hiệu kháng HBs của virus viêm gan B là Second International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human NIBSC code: 07/164, hàm lượng: 100IU/ống. Mẫu thử nghiệm là mẫu sinh phẩm ImmunoHBs180IU.

2.2.2. Thiết bị và dụng cụ: Bàn máy ELISA, tủ lạnh, micropipet các loại (đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025).

2.3. Phương pháp nghiên cứu: Phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.3.1. Tóm tắt quy trình thử nghiệm

Bước 1: Nhỏ 50 µl dung dịch pha loãng mẫu (DILSPE) trừ giếng trắng

Bước 2: Nhỏ 100 µl chất hiệu chuẩn (CAL)

Bước 3: Nhỏ 100 µl mẫu thử đã pha loãng n lần*

Bước 4: Nhỏ 100 µl huyết thanh chứng (CONTROL)

Dán phiến, Ủ 37°C /60 phút

Rửa phiến 4-5 lần

Bước 5: Nhỏ 100 µl Enzyme CONJ **trừ giếng trắng**

Dán phiến, Ủ 37°C /60 phút

Rửa phiến 4-5 lần

Bước 6: Nhỏ 100 µl SUBS TMB **bao gồm cả giếng trắng**

Ủ tối / nhiệt độ phòng / 20 phút

Nhỏ 100 µl H₂SO₄

Bước 7: Đọc và phân tích kết quả **trong vòng 20 phút** bằng phần mềm phân tích kết quả của thiết bị.**

Ghi chú:

* Mẫu thử được hiểu là mẫu chuẩn quốc tế và mẫu sinh phẩm cần định lượng hàm lượng kháng thể.

Sau khi có kết quả ở mục **, tính toán hàm lượng kháng thể có trong mẫu bằng cách nhân với hệ số pha loãng n.

Đánh giá kết quả mẫu thử: Hàm lượng ước tính của mẫu không nhỏ hơn hàm lượng ghi trên nhãn. Khoảng tin cậy 95% của hàm lượng ước tính nằm trong khoảng từ 80% đến 125%.

2.3.2 Đánh giá các tiêu chí thẩm định phương pháp ELISA định lượng khi áp dụng trên mẫu huyết thanh người chứa kháng thể viêm gan siêu vi B.

- Xác định tính tuyến tính

Bố trí thử nghiệm và tính kết quả

Sử dụng mẫu chuẩn quốc tế có hàm lượng 100IU /ampoule. Pha loãng mẫu chuẩn tại 5 nồng độ dùng để dựng đường chuẩn. Các nồng độ mẫu chuẩn dựng kiến pha phải nằm trong dải nồng độ của các chất hiệu chuẩn của kit. Chọn nồng độ mẫu chuẩn dựng đường chuẩn là 167U/L, 100IU/L, 50IU/L, 10IU/L tương ứng với việc pha loãng mẫu chuẩn gốc 1/600, 1/1.000, 1/2.000, 1/10.000 theo như bảng 2.1.

Bảng 1. Pha mẫu cho đánh giá tính tuyến tính phương pháp

Nồng độ mẫu chuẩn (IU/L)	Tỷ lệ pha loãng	Ký hiệu	Thể tích mẫu chuẩn (ml)	Thể tích DD pha loãng (ml)
100.000		C		
10.000	1/10	C1	0,9 C	8,1
1.000	1/100	C2	1 C1	9
167	1/600	C3	1 C2	5
100	1/1000	C4	1 C2	9
50	1/2000	C5	1 C4	1
10	1/10.000	C6	1 C5	4

Thực hiện 6 lần dựng đường chuẩn với 5 điểm dựng đường chuẩn là các nồng độ trên và Cal 1 của bộ kit có nồng độ kháng thể là 0IU/L. Sử dụng mẫu chuẩn pha loãng về nồng độ 50IU/L làm mẫu thử (A)

Phương pháp tính kết quả: Xác định hệ số hồi quy tuyến tính R^2 của từng đường chuẩn. Tính giá trị trung bình, SD và %RSD của mẫu thử A trong từng lần thử nghiệm.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Phương pháp được coi là tuyến tính nếu hệ số tương quan tuyến tính $0,6 < R^2 < 1$ và $RSD \leq 20\%$

- Xác định giới hạn định lượng (LOQ)

Bố trí thử nghiệm.

Thực hiện trên tối thiểu 3 nồng độ mẫu chuẩn pha loãng gần với giá trị LOD của bộ kit, mỗi nồng độ lặp lại tối thiểu 20 lần theo hướng dẫn của CLSI-EP17A: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline [1]

Giới hạn phát hiện công bố của bộ sinh phẩm là 10 IU/L, do đó, chọn 3 nồng độ mẫu chuẩn tương ứng để xác định giới hạn phát hiện của quy trình là 0, 10, 20 IU/L.

Coi mẫu chuẩn là mẫu thử, thực hiện thử nghiệm xác định hàm lượng anti HBs trong mẫu thử theo quy trình đã mô tả

Cách tính kết quả: Tìm giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ thấp nhất cho kết quả dương tính trong 95% số lần thử nghiệm. Sử dụng chương trình PODLOD calculation program, version 9 để tính LOD 95. Tính giới hạn định lượng: LOQ = 3xLOD

2.3.3 Xác định độ đúng

Bố trí thử nghiệm: Sử dụng mẫu chuẩn quốc tế có hàm lượng 100IU /ampoule. Pha loãng mẫu chuẩn tại 3 nồng độ, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần vào 3 ngày khác nhau. Mẫu chuẩn được pha về các nồng độ mà kit ELISA phát hiện được (lớn hơn 10IU/L, nhỏ hơn 250IU/L - điều này được ghi rõ trong hướng dẫn sử dụng kit). Chọn 3 nồng độ mẫu chuẩn lý thuyết đưa vào thử nghiệm là: 20IU/L, 50IU/L, 100IU/L.

Pha mẫu chuẩn gốc từ nồng độ 100IU/ampoule thành 3 nồng độ như sau:

+ Hoàn nguyên 1ml nước cất và 1 ampoule chứa 100IU mẫu chuẩn Quốc tế đông khô ta được dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ 100IU/ml = 100.000IU/L.

+ Sử dụng dung dịch Cal1 (0IU/ml) của bộ sinh phẩm làm dung dịch pha loãng mẫu chuẩn, pha theo bảng 2.

Bảng 2. Công thức pha mẫu đánh giá độ đúng phương pháp

Nồng độ mẫu chuẩn (IU/L)	Tỷ lệ pha loãng MC	Ký hiệu	Thể tích mẫu chuẩn (ml)	Thể tích DD pha loãng (ml)
100000		C		
10000	1/10	C1	0,9 C	8,1
1000	1/100	C2	1 C1	9
200	1/500	C3	1 C2	4
100	1/1000	C4	1 C3	1
50	1/2000	C5	1 C4	1
20	1/5000	C6	1 C5	1,5

Coi mẫu chuẩn đã pha loãng thành 3 nồng độ là mẫu thử, thực hiện theo quy trình mô tả, từ kết quả thu được, tính hàm lượng trung bình quy đổi của mẫu chuẩn trong các lần thử.

So sánh kết quả thu được với giá trị biết trước của mẫu chuẩn bằng cách sử dụng hàm T test. So sánh với t_{α} của bảng phân bố Student tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

Tiêu chuẩn chấp thuận: $T < t_{\alpha}$.

2.3.4 Xác định độ chính xác

- Xác định độ lặp lại

Thiết kế thử nghiệm và tính kết quả

Thử nghiệm xác định độ lặp lại được thực hiện trên mẫu thử là mẫu sinh phẩm Immuno HBs 180 IU, do 1 nhóm kỹ thuật viên thực hiện, trong cùng điều kiện trang thiết bị, hóa chất, nguyên vật liệu, lặp lại 9 lần trong 1 ngày. Vì nồng độ mẫu thử ước đoán nằm ngoài khoảng phát hiện của sinh phẩm nên cần pha loãng mẫu thử từ nồng độ ước đoán (200IU/ml tương ứng 200.000IU/L) về nồng độ mà kit ELISA phát hiện được (100IU/L): pha loãng 2000 lần

Sử dụng dung dịch Cal1 (0IU/ml) của bộ sinh phẩm làm dung dịch pha loãng mẫu thử, pha theo bảng 2.

Bảng 3. Pha loãng mẫu đánh giá độ chính xác phương pháp

Tỷ lệ pha loãng (IU/L)	Ký hiệu	Thể tích mẫu chuẩn (ml)	Thể tích DD pha loãng (ml)
	T		
1/10	T1	1 T	9
1/100	T2	1 T1	9
1/1000	T3	1 T2	9
1/2000	T4	1 T3	1

Thực hiện xác định nồng độ mẫu thử đã pha loãng theo quy trình mô tả

- Tính giá trị trung bình, SD và RSD% hay CV của mẫu thử

Tiêu chuẩn chấp thuận: CV <10%

- Độ chính xác trung gian

Thiết kế thử nghiệm và tính kết quả

- Thử nghiệm xác định độ chính xác trung gian được thực hiện trên mẫu thử được pha thành các nồng độ khác nhau bởi 2 nhóm thực hiện, trong cùng điều kiện trang thiết bị, hóa chất, nguyên vật liệu, 5 ngày khác nhau.

- Tính giá trị trung bình, SD và CV của từng nhóm.

Tiêu chuẩn chấp thuận: CV <10%

- Tính giá trị trung bình, SD và CV của chung 2 nhóm

Tiêu chuẩn chấp thuận: CV <10%

2.3.5 Xác định độ mạnh phương pháp

- Sử dụng kết quả độ chính xác trung gian để đánh giá độ mạnh.
- + Tính kết quả hàm lượng trung bình, SD, CV của từng nhóm của từng nhóm.
- + Tính giá trị T_{test} (Sử dụng phần mềm Excel, hàm T-test): $T_{test} = 0,465$

So sánh với giá trị t của bảng phân phối Student để đưa ra kết luận về sự khác biệt giữa 2 nhóm

Tiêu chuẩn chấp thuận: $T_{test} \leq t_{bảng}$ ($t_{bảng}$ tra trong bảng phân phối Student) tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ (độ tin cậy 95%). CV < 20%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1 Kết quả đánh giá độ tuyến tính phương pháp

Đánh giá độ tuyến tính của phương pháp được thực hiện ít nhất 6 lần thử nghiệm với độ pha loãng mẫu chuẩn 5 độ pha để cho kết quả đánh giá độ tuyến tính của phương pháp như bảng 1.

Bảng 1. Tổng hợp kết quả độ tuyến tính của quy trình ELISA định lượng xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs trong sản phẩm Immuno HBs.

Lần thử nghiệm	Phương trình đường chuẩn	Hệ số hồi quy tuyến tính	Kết quả mẫu thử
Lần 1	$y = -1,821E-05x^2 + 0,0159111x + 0,0592869$	$R^2 = 1$	56,23 IU/ml
Lần 2	$y = -3.14918E-05x^2 + 0.0249599x + 0.0688$	$R^2 = 0,999$	55,88 IU/ml
Lần 3	$y = -1,2634E-05x^2 + 0,00650216x + 0,115277$	$R^2 = 0,988$	54,85 IU/ml
Lần 4	$y = -2,821E-05x^2 + 0,0159111x + 0,0592869$	$R^2 = 1$	56,23 IU/ml
Lần 5	$y = -1,58006E-05x^2 + 0,0157397x + 0,0588867$	$R^2 = 1$	55,8 IU/ml
Lần 6	$y = -2.65533E-05x^2 + 0.0210124x + 0.1152$	$R^2 = 0,988$	54,05 IU/ml
Trung bình mẫu thử			55,51 IU/ml
SD			0,87 IU/ml
CV			1,57 IU/ml

Kết quả bảng 1 cho thấy trên mẫu thử có hàm lượng lý thuyết 50IU/ml cho kết quả từ đường chuẩn là 54,05 IU/L. Giá trị trung bình và CV của mẫu thử dựa trên 6 đường chuẩn là 55,51 IU/L; SD = 0,87; CV = 1,57% (<20%). Như vậy, đối chiếu với tiêu chuẩn của độ tuyến tính là hệ số tương quan tuyến tính R^2 nằm trong khoảng 0,6 -1, CV < 20%, quy trình ELISA định lượng này có mối tương quan chặt chẽ giữa nồng độ kháng thể anti-HBs và mật độ quang đo được, đạt yêu cầu về tính tuyến tính giữa 2 đại lượng.

3.2 Kết quả xác định giới hạn định lượng (LOQ)

Đánh giá giới hạn định lượng của phương pháp được thực hiện ít nhất 20 lần thử nghiệm với 03 nồng độ pha loãng mẫu chuẩn với 5 độ pha để cho kết quả đánh giá giới hạn định lượng của phương pháp như bảng 2.

Bảng 2. Tổng hợp kết quả xác định giới hạn định lượng của quy trình ELISA định lượng xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs trong sản phẩm Immuno HBs.

Nồng độ (IU/L)	Tổng số lần thực hiện	Số lần cho kết quả dương tính
0	20	0
10	20	18
20	20	20

Sử dụng chương trình PODLOD calculation program, version 9 để tính LOD 95 đạt được kết quả LOD 95= 12,227 (95% CI: 7,288-20,514). Giới hạn định lượng: LOQ = 3xLOD = 12,227 x 3 = 36,681 (IU/L). Kết quả này cho thấy quy trình ELISA định lượng có thể cho kết quả định lượng chính xác khi định lượng các sản phẩm Immunoglobulin có hàm lượng

anti HBs từ 36,7 IU/L. Hiện tại hầu hết các sản phẩm Immuno HBs chứa hàm lượng kháng thể anti-HBs từ 180-200 IU. Do vậy, sử dụng quy trình ELISA định lượng này sẽ cho kết quả định lượng phù hợp và chính xác.

3.3 Kết quả đánh giá độ đúng phương pháp

Đánh giá độ đúng của phương pháp được thực hiện ít nhất 3 lần thử nghiệm độc lập cho kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp như bảng 3.3.

Bảng 3. Tổng hợp kết quả độ đúng của quy trình ELISA định lượng xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs trong sản phẩm Immuno HBs.

Nồng độ 20 IU/L			Nồng độ 50 IU/L			Nồng độ 100 IU/L		
Lần TN	Kết quả (IU/L) (A)	Nồng độ quy đổi (Ax5000/1000) IU/ml	Lần TN	Kết quả (IU/L) (B)	Nồng độ quy đổi (Bx2000/100) IU/ml	Lần TN	Kết quả (IU/L) (C)	Nồng độ quy đổi (Cx1000/100) IU/ml
Lần 1	20,23	101,127	1	50,13	100,260	1	110,70	110,70
Lần 2	20,13	100,648	2	49,35	98,693	2	106,63	106,63
Lần 3	20,28	101,423	3	50,8	101,600	3	101,36	101,36

Tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn; X tb = 102,49 (IU/ml), SD= 3,7. So sánh kết quả thu được với giá trị biết trước của mẫu chuẩn bằng cách sử dụng hàm T test. So sánh với t_{α} của bảng phân bố Student tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

$$t = \frac{|xtb - xmc|}{s / \sqrt{n}}$$

Trong đó: - s: độ lệch chuẩn; - n: số thử nghiệm

Thay số vào ta có: $t = \frac{|xtb - xmc|}{s / \sqrt{n}} = (102,49 - 100) / 3,75 / \sqrt{9} = 1,99$. Tra bảng Student với

bậc tự do n=6, $\alpha = 0,05$ có $t_{\alpha} = 2,015$, Như vậy $t < t_{\alpha}$. *Đối chiếu với tiêu chuẩn chấp thuận: $t < t_{\alpha}$ có thể kết luận quy trình quy trình ELISA định lượng này đạt yêu cầu về độ đúng phương pháp.*

3.4 Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp

3.4.1 Kết quả đánh giá độ lặp lại

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá trên 9 lần thử nghiệm độc lập cho kết quả như bảng 4.

Bảng 4. Tổng hợp kết quả xác định độ lặp lại của quy trình ELISA định lượng xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs trong sản phẩm Immuno-HBs.

Lần thử nghiệm	Kết quả T4 (IU/L)				Nồng độ ban đầu quy đổi (IU/ml) (=TBx2000/1000)	Trung bình (IU/ml)	SD	CV (%)
	1	2	3	TB				
1	132.5	140.8	141.8	138.4	276.7	267,3	10,63	3,98
2	125.9	123.8	125.7	125.1	250.3			
3	137.9	135.3	138.0	137.1	274.2			
4	130.4	137.6	144.8	137.6	275.2			
5	132.2	139.6	135.5	135.8	271.5			
6	120.9	130.5	137.3	129.6	259.1			
7	132.6	146.7	141.3	140.2	280.4			
8	132.5	124.2	126.5	127.7	255.5			
9	129.8	135.2	129.1	131.4	262.8			

Kết quả bảng 4 sau khi chiếu với tiêu chuẩn chấp thuận là CV <10%, quy trình quy trình ELISA định lượng xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs trong nghiên cứu này cho kết quả với hệ số biến thiên là 3,98%, đạt yêu cầu cao về độ lặp lại. Các kết quả thu được là giống nhau khi lặp lại thử nghiệm nhiều lần.

3.4.2 Kết quả đánh giá độ chính xác trung gian của phương pháp

Độ chính xác trung gian của phương pháp được đánh giá kết quả của 2 nhóm kỹ thuật thực hiện độc lập, thử nghiệm được lặp lại 5 lần cho kết quả ở bảng 5 và 6 và 7.

Bảng 5. Tổng hợp kết quả nhóm kỹ thuật thực hiện 1

Lần thử nghiệm	Kết quả T4 (IU/L)				Nồng độ ban đầu quy đổi (IU/ml) (=TB x 2000/1000)	Trung bình (IU/ml)	SD	CV (%)
	1	2	3	TB				
1	132,5	140,8	141,8	138,4	276,7	269,58	10,94	4,0
2	125,9	123,8	125,7	125,1	250,3			
3	137,9	135,3	138,0	137,1	274,2			
4	130,4	137,6	144,8	137,6	275,2			
5	132,2	139,6	135,5	135,8	271,5			

Bảng 6. Tổng hợp kết quả nhóm kỹ thuật thực hiện 2

Lần thử nghiệm	Kết quả T4 (IU/L)				Nồng độ ban đầu quy đổi (IU/ml) (=TB x 2000/1000)	Trung bình (IU/ml)	SD	CV (%)
	1	2	3	TB				
1	148,4	133,0	151,0	144,133	288,27	276,36	15,86	6,0
2	143,4	125,3	146,8	138,5	277,00			
3	153,7	131,0	158,4	147,7	295,40			
4	130,9	123,781	134,2	129,627	259,25			
5	131,9	126,127	134,8	130,942	261,88			

Bảng 7. Tổng hợp kết quả của cả hai nhóm kỹ thuật thực hiện

Nhóm	Số lần TN	Kết quả T4 (IU/L)				Nồng độ ban đầu quy đổi (IU/ml)	Trung bình (IU/ml)	SD	CV (%)
		1	2	3	TB				
Nhóm 1	1	132,5	140,8	141,8	138,4	276,7	272,97	13,338	4,9
	2	125,9	123,8	125,7	125,1	250,3			
	3	137,9	135,3	138,0	137,1	274,2			
	4	130,4	137,6	144,8	137,6	275,2			
	5	132,2	139,6	135,5	135,8	271,5			
Nhóm 2	1	148,4	133,0	151,0	144,133	288,27	272,97	13,338	4,9
	2	143,4	125,3	146,8	138,5	277,00			
	3	153,7	131,0	158,4	147,7	295,40			
	4	130,9	123,781	134,2	129,627	259,25			
	5	131,9	126,127	134,8	130,942	261,88			

Kết quả đánh giá độ chính xác trung gian tại bảng 3.5, bảng 3.6 và bảng 3.7 sau khi đối chiếu với tiêu chuẩn chấp thuận là CV <10%, quy trình ELISA định lượng xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs trong nghiên cứu này cho kết quả với hệ số biến thiên dao động từ 4-6%, đạt yêu cầu cao về độ chính xác trung gian. Các kết quả thu được là giống nhau khi lặp lại thử nghiệm nhiều lần, nhiều ngày khác nhau và với các nhóm kỹ thuật viên khác nhau

3.1.5 Kết quả đánh giá độ mạnh của phương pháp

Độ mạnh của phương pháp được thực hiện trên hai nhóm kỹ thuật với thời gian khác nhau với số lần thực hiện thử nghiệm lặp lại là 6 lần cho kết quả trung bình mỗi nhóm như bảng 8.

Bảng 8. Tổng hợp kết quả xác định độ mạnh của 2 nhóm kỹ thuật

Nhóm thực hiện	Nồng độ trung bình (IU/ml)	SD	CV (%)
Nhóm 1	296,58	10,94	4,0
Nhóm 2	276,36	15,86	6,0

Kết quả sau khi tính toán theo phương pháp so sánh $T_{\text{test}} = 0,46$, tra bảng $t_{\text{bảng}} = 2,132$. Đối chiếu với tiêu chuẩn chấp thuận, $T_{\text{test}} \leq t_{\text{bảng}}$ ($t_{\text{bảng}}$ tra trong bảng phân phối Student) tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, tức với độ tin cậy 95% và $CV < 20\%$, quy trình ELISA định lượng xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs trong nghiên cứu này đạt yêu cầu cao về độ mạnh.

4. KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu này chứng minh quy trình ELISA định lượng xác định hiệu giá kháng thể anti-HBs trong sản phẩm Immuno-HBs là phương pháp miễn dịch phù hợp, đạt yêu cầu khi đánh giá về độ tuyến tính, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian), độ mạnh theo tiêu chuẩn ISO 17025: 2015. Từ kết quả nghiên cứu này có thể sử dụng phương pháp ELISA định lượng cho kiểm định công hiệu của sản phẩm Immuno-HBs chứa 180-200IU kháng thể anti-HBs tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. CLSI-EP17A: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline
2. SOP KĐQG -34: Quy trình thẩm định thử nghiệm.
3. Validation of analytical assays (WHO/VSQ/97.02)
4. ICH guideline (ICH –Q2A; ICH – Q2B).
5. WHO in- country workshop on analytical method validation, 17 February 2014, Ha Noi – Viet Nam.

Abstract

APPLYING QUANTITATIVE ELISA METHOD TO TEST THE POTENCY OF BIOLOGICAL IMMUNO-HBS PRODUCTS CONTAIN ANTIBODIES AGAINST HEPATITIS B VIRUS

Pham Van Hung et al

National Institute for control of vaccine and biological

Applying the quantitative ELISA method to test the effectiveness of Immuno-HBs biological products containing antibodies to hepatitis B virus through assessment the suitability of the process, including linearity, limit of quantification, accuracy, and precision and robustness of the method. The evaluation criteria for the results are satisfactory in terms of (linearity; limit of quantification (LOQ); precision; accuracy; strength) and all meet acceptable and applicable standards. Quantitative ELISSA method for testing the effectiveness of Immuno HBs products with the concentration of 180-200 IU/ml.

Keywords: *ELISA method, Immuno-HBs, Potency*

Cán bộ phản biện

PGS.TS. Cao Bá Lợi

Ngày nhận bài: 18/04/2022

Ngày gửi phản biện: 21/04/2022

Ngày đăng bài: 05/05/2022