

ESTABLISHMENT OF STANDARDIZED IgM AND IgG ANTIBODY REFERENCE PANELS FOR QUALITY EVALUATION OF SEROLOGICAL DENGUE IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICES

Tran Thi Trang Huyen¹, Le Thi Thu Ha², Pham Thi Hong Thuy¹, Vu Thi Thu Huong^{1*}

¹ National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

² Hanoi Medical University

Received 05 December 2025

Accepted 31 March 2026

Abstract: Dengue fever is a major infectious disease caused by the Dengue virus. Accurate diagnostic devices play a critical role in supporting the definitive diagnosis of Dengue patients for early and timely treatment. This study was conducted to establish Dengue virus-specific IgM and IgG antibody reference panels for the quality assessment of *in vitro* diagnostic (IVD) medical devices. The study utilized positive and negative IgM/IgG serum samples collected at Hanoi Medical University Hospital from April 2024 to May 2025. All samples were processed and strictly stored at -70°C. Sample characteristics were determined using three methods: ELISA (Diapro - Italy), rapid immunochromatography (SD Biosensor - South Korea), and fluorescence immunoassay (FIA) (SD Biosensor - South Korea). The study successfully established four reference panels: Dengue IgM positive/negative and Dengue IgG positive/negative panels, each consisting of 50 members. Characteristics were confirmed using ELISA as the reference method. Stability testing demonstrated that the panels, stored at -70°C, remained stable after six freeze-thaw cycles. The established reference panels meet the technical requirements for pre-market and post-market quality control of Dengue diagnostic devices.

Keywords: Dengue fever, Dengue virus, standardized reference panel, *in vitro* diagnostic device.

* Corresponding author:

E-mail address: huongvu.nicvb@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v6i1.247>

XÂY DỰNG CÁC BỘ MẪU CHUẨN KHÁNG THỂ IgM VÀ IgG ĐỂ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG THIẾT BỊ CHẨN ĐOÁN BỆNH SỐT DENGUE BẰNG PHƯƠNG PHÁP HUYẾT THANH HỌC

Trần Thị Trang Huyền¹, Lê Thị Thu Hà², Phạm Thị Hồng Thủy¹, Vũ Thị Thu Hương^{1*}

¹ Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

² Đại học Y Hà Nội

Nhận ngày 05 tháng 12 năm 2025

Chấp nhận đăng ngày 31 tháng 03 năm 2026

Tóm tắt: Sốt Dengue là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm do vi rút Dengue gây ra. Các thiết bị chẩn đoán Dengue đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ chẩn đoán xác định bệnh nhân nhiễm Dengue để điều trị sớm và kịp thời. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng bộ mẫu chuẩn kháng thể IgM và IgG đặc hiệu với vi rút Dengue phục vụ kiểm định chất lượng thiết bị y tế chẩn đoán in vitro (IVD). Đối tượng nghiên cứu nghiên cứu là các mẫu huyết thanh của người dương tính và âm tính với kháng thể IgM/IgG được thu thập tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ 4/2024 đến tháng 5/2025. Các mẫu được xử lý và bảo quản nghiêm ngặt ở -70°C. Đặc tính mẫu được xác định bằng ba phương pháp: ELISA (Diapro - Italy), sắc ký miễn dịch nhanh (SD Biosensor - Hàn Quốc), và miễn dịch huỳnh quang FIA (SD Biosensor - Hàn Quốc). Nghiên cứu đã thiết lập thành công 4 bộ mẫu, bao gồm: bộ mẫu chuẩn dương tính và âm tính với kháng thể IgM của vi rút Dengue (50 thành viên/bộ) và bộ mẫu chuẩn dương tính và âm tính với kháng thể IgG của vi rút Dengue (50 thành viên/bộ). Các thành viên trong bộ mẫu đều có đặc tính xác định rõ ràng bằng phương pháp tham chiếu ELISA, đạt độ ổn định sau 6 lần tan đông khi bảo quản ở -70°C. Sản phẩm của nghiên cứu là bộ mẫu chuẩn được sử dụng trong kiểm định tiền kiểm và hậu kiểm thiết bị y tế chẩn đoán Dengue.

Từ khoá: Sốt Dengue, vi rút Dengue, bộ mẫu chuẩn, thiết bị chẩn đoán IVD

1. Đặt vấn đề

Sốt Dengue là bệnh truyền nhiễm do vi rút Dengue gây ra, lưu hành rộng rãi tại nhiều quốc gia nhiệt đới, trong đó có Việt Nam. Việc chẩn đoán sớm và chính xác bệnh Dengue có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong thực hành lâm sàng cũng như trong phòng chống dịch [1-3]. Các thiết bị chẩn đoán in vitro (IVD) phát hiện vi rút Dengue hiện nay khá đa dạng, khác nhau về nguyên lý xét nghiệm và mục đích sử dụng. Thiết bị chẩn đoán phát hiện kháng nguyên NS1 và kháng thể IgM/ IgG kháng Dengue trong huyết thanh/ huyết tương đang được

ứng dụng rộng rãi nhờ khả năng phát hiện bệnh chính xác tại nhiều giai đoạn bệnh khác nhau, nhanh chóng, dễ thực hiện và tiện dụng. Tuy nhiên, công bố hiệu năng của các thiết bị chẩn đoán IVD này rất khác nhau về độ nhạy, độ đặc hiệu, phụ thuộc vào công nghệ sản xuất, quy cách đóng gói, điều kiện bảo quản, cũng như bộ mẫu chuẩn sử dụng để kiểm định chất lượng thiết bị y tế chẩn đoán của từng quốc gia [4-6]

Việc xây dựng các bộ mẫu huyết thanh chuẩn, phù hợp đặc điểm sinh học của quần thể người và đặc điểm dịch tễ của chủng vi rút Dengue lưu hành tại Việt Nam là quan trọng trong kiểm định chất lượng thiết bị y tế chẩn đoán. Các bộ mẫu huyết thanh chuẩn được xác định và khẳng định đặc tính mang dấu ấn huyết thanh học (IgM, IgG, NS1) chính xác và đầy đủ, là cơ sở khoa học và thực tiễn vững chắc giúp các cơ sở kiểm nghiệm chất lượng cũng như các nhà sản xuất thiết bị chẩn đoán in vitro công cụ để đánh giá độ chính xác về hiệu năng chẩn đoán của các thiết bị chẩn đoán Dengue từ huyết thanh, từ đó góp phần nâng cao chất lượng xét nghiệm, giúp giám sát dịch và điều trị hiệu quả [7].

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế là cơ quan Trung ương được Bộ Y tế giao cho trách nhiệm đánh giá, kiểm tra, giám sát chất lượng các thiết bị y tế chẩn đoán nói chung, thiết bị y tế chẩn đoán vi rút Dengue nói riêng. Để đánh giá hiệu năng của thiết bị chẩn đoán Dengue, nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng bộ mẫu chuẩn kháng thể IgM, IgG cho chẩn đoán huyết thanh học nhiễm vi rút Dengue.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, địa điểm, thời gian nghiên cứu

* **Đối tượng nghiên cứu:** Các mẫu bệnh phẩm huyết thanh người của bệnh nhân nghi ngờ mắc sốt xuất huyết được gửi tới làm xét nghiệm nhanh sốt Dengue tại Đơn vị Vi sinh - Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm được lưu giữ và chuyển đến phòng xét nghiệm Khoa Kiểm định Sinh phẩm Y tế - Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB). Tất cả các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ âm sâu -70°C , đảm bảo điều kiện bảo quản và xử lý theo đúng quy trình.

* **Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu:**

- Mẫu huyết thanh dương tính với IgM thu thập từ những người có triệu chứng nghi ngờ sốt xuất huyết, có kết quả dương tính với xét nghiệm Dengue IgM và/hoặc Dengue NS1 hoặc đã được chẩn đoán xác định là có bệnh trên lâm sàng.

- Mẫu huyết thanh âm tính với IgM thu thập từ những người có chỉ định xét nghiệm chẩn đoán Dengue nhưng có kết quả xét nghiệm âm tính với Dengue IgM và/ hoặc Dengue NS1.

- Mẫu huyết thanh dương tính với IgG thu thập từ là những người nghi ngờ sốt xuất

huyết, có kết quả dương tính với xét nghiệm Dengue IgG và/hoặc NS1.

- Mẫu huyết thanh âm tính với IgG thu thập từ những người có chỉ định xét nghiệm chẩn đoán Dengue nhưng có kết quả xét nghiệm âm tính với Dengue IgG và/hoặc Dengue NS1 hoặc được chẩn đoán xác định không nhiễm Dengue tại thời điểm thu thập.

* **Thời gian nghiên cứu:** từ tháng 4 năm 2024 đến tháng 5 năm 2025

2.2. Thiết kế nghiên cứu

Mô tả trong phòng thí nghiệm

2.3. Nội dung nghiên cứu

2.3.1. Xác định cỡ mẫu

Nghị viện và Hội đồng Châu Âu (EU) ngày 4 tháng 7 năm 2022 đặt ra các thông số kỹ thuật chung cho một số thiết bị y tế chẩn đoán in vitro nhóm D, trong đó quy định cỡ mẫu cho xác nhận độ nhạy và độ đặc hiệu tối thiểu là 25 mẫu [8]. Theo tài liệu của Viện tiêu chuẩn lâm sàng và phòng thí nghiệm Hoa Kỳ (Clinical and Laboratory Standard Institute), việc xác định cỡ mẫu tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu với mong muốn một khoảng tin cậy phù hợp. Trong trường hợp chọn cỡ mẫu là 50, khoảng tin cậy tương ứng sẽ là 78-97% [9]. Nhóm nghiên cứu căn cứ vào các hướng dẫn trên, chọn cỡ mẫu cho mỗi bộ mẫu là 50 mẫu.

2.3.2. Thu thập và bảo quản mẫu

Thu thập thông tin mẫu lâm sàng từ bệnh viện gồm: Tên, tuổi, địa chỉ, giới tính, chẩn đoán, kết quả xét nghiệm công thức máu, kết quả xét nghiệm kháng nguyên/ kháng thể Dengue. Mẫu sau xét nghiệm được vận chuyển, bảo quản, ly tâm mẫu theo các quy trình đảm bảo chất lượng mẫu và an toàn sinh học. Mẫu huyết thanh/ huyết tương đã được lấy và bảo quản ở nhiệt độ -70°C , sau khi vận chuyển mẫu về NICVB, rã đông mẫu, chia mẫu vào các tuýp với thể tích khác nhau để thực hiện các nội dung công việc tiếp theo: xác định đặc tính, đánh giá độ ổn định, lưu giữ để chia và sắp xếp vào bộ mẫu.

2.3.3. Xác định đặc tính mẫu dương tính và âm tính với kháng thể IgM và IgG kháng Dengue

Tổ chức Y tế Thế giới đánh giá chất lượng thiết bị y tế (TBYT) chẩn đoán kháng thể Dengue trên các mẫu lâm sàng có kết quả dương tính và âm tính với kháng thể Dengue bằng phương pháp ELISA [10]. Công ty sản xuất mẫu chuẩn Sera Care sản xuất bộ mẫu chuẩn kháng thể Dengue IgM/IgG gồm 15 mẫu thành viên có kết quả xác định đặc tính bằng phương pháp ELISA [11]. Do đó, trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu cũng sử dụng phương pháp ELISA làm phương pháp tham chiếu để xác định đặc tính các mẫu thành viên của bộ mẫu. Tuy nhiên, nhóm nghiên cứu sử dụng thêm phương pháp sắc ký miễn dịch và miễn dịch gắn huỳnh quang để làm tăng độ chính xác của kết quả xác định đặc tính. Mẫu có

kết quả đồng thuận bằng phương pháp ELISA và 1 trong 2 phương pháp còn lại sẽ được chọn để đưa vào bộ mẫu.

Xác định đặc tính mẫu để lựa chọn vào bộ IgM bằng các sinh phẩm sau:

Sinh phẩm 1: Dengue vi rút IgM/ IgG Diapro Diagnostic Bioprobes - Italy, có độ nhạy > 98%, độ đặc hiệu > 98%, có nguyên lý xét nghiệm theo phương pháp miễn dịch gắn men [12].

Sinh phẩm 2: Khay thử xét nghiệm định tính kháng thể IgM/IgG kháng vi rút Dengue, SD Biosensor - Hàn Quốc, có độ nhạy đối với IgM là > 97%, độ đặc hiệu đối với IgM là > 96%, có nguyên lý xét nghiệm theo phương pháp sắc ký miễn dịch [13].

Sinh phẩm 3: là FIA Dengue IgM/IgG, SD Biosensor - Hàn Quốc, có độ nhạy và độ đặc hiệu > 98%, có nguyên lý xét nghiệm theo phương pháp miễn dịch gắn huỳnh quang[14].

Mẫu được xác định đặc tính bằng phương pháp ELISA và sắc ký miễn dịch. Những mẫu có kết quả tương đồng bằng 2 phương pháp trên được chọn vào bộ mẫu. Những mẫu có kết quả không tương đồng tiếp tục được xác định bằng phương pháp miễn dịch gắn huỳnh quang.

Mỗi bộ mẫu dương tính phải bao gồm các dải nồng độ trong đó có các mẫu dương tính thấp và dương tính trung bình. Mẫu dương tính trung bình là mẫu có nồng độ chất phân tích nằm trong khoảng từ 2 đến 3 lần giá trị ngưỡng [15]. Mẫu dương tính thấp là mẫu có nồng độ chất phân tích cao hơn giá trị ngưỡng nhưng thấp hơn mẫu dương tính trung bình. Về tỷ lệ các nhóm mẫu trong bộ mẫu, không có hướng dẫn cụ thể cho bộ mẫu Dengue, tuy nhiên tham khảo khuyến cáo của WHO về tỷ lệ mẫu dương tính có nồng độ thấp của bộ mẫu SARS-CoV-2 thì nhóm mẫu dương tính thấp chiếm tỷ lệ từ 10% đến 20% [15]. Nhóm nghiên cứu dự kiến về cơ cấu mẫu của bộ mẫu dương tính bao gồm các mẫu có nồng độ kháng thể cao, trung bình, thấp với tỷ lệ tương ứng dự kiến khoảng 40%: 40%: 20%. Tỷ lệ này có thể thay đổi tùy thuộc vào số lượng mẫu bệnh phẩm thu thập được trong thời gian nghiên cứu tại địa điểm thu thập mẫu, nhưng vẫn đảm bảo 03 dải nồng độ kháng thể, mẫu có nồng độ thấp chiếm tối thiểu 20%.

Mỗi mẫu được lựa chọn vào bộ mẫu sẽ được chia thành 2 tuýp, mỗi tuýp chứa 250µl huyết tương, đựng trong tuýp nhựa vô trùng 1 ml của hãng CryoKing, tuýp nhựa này có khả năng bảo quản mẫu ở điều kiện -70°.

2.4. Đánh giá độ ổn định của bộ mẫu theo số chu kỳ đông băng/tan đông.

Nghiên cứu đánh giá độ ổn định của bộ mẫu theo số chu kỳ đông băng/tan đông được thực hiện theo hướng dẫn của cơ quan quản lý dược phẩm Châu Âu (European Medicine

Agency) [16]. Xác định đặc tính mẫu tại thời điểm t_0 (thời điểm nhận mẫu tại NICVB - tan đông lần 1) và (t_3, t_4, t_5) tương ứng với số lần tan đông thứ 4, 5, 6. Các chu kỳ đông băng/tan đông cách nhau tối thiểu 12 giờ. Số lượng mẫu sử dụng để đánh giá: 10 mẫu (3 mẫu dương/1dải nồng độ + 1 mẫu âm). Xác định đặc tính mẫu tại mỗi thời điểm tan đông bằng: lặp lại 3 lần/1 mẫu. Số liệu thu được là giá trị COI (chỉ số ngưỡng) của từng mẫu tại mỗi thời điểm. Tính giá trị COI trung bình và CV của từng mẫu sau mỗi chu kỳ đông/ tan và so sánh sự dao động của giá trị COI của mẫu giữa các chu kỳ tan băng.

2.5. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu thu thập được ghi lại bằng Excel và được phân tích bởi phần mềm thống kê SPSS . Các biến định lượng được thể hiện bằng số trung bình và độ lệch chuẩn, hệ số biến thiên, các biến định tính được thể hiện bằng tỷ lệ %. So sánh các giá trị trung bình của biến định lượng bằng các phép thử thống kê. Nếu $p < 0,05$ thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nếu $p > 0,05$ thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

2.6. Đạo đức nghiên cứu:

Nghiên cứu sử dụng mẫu hồi cứu, được sự cho phép của Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Thông tin của bệnh nhân trên các mẫu bệnh phẩm được mã hoá, bảo mật và chỉ sử dụng cho mục đích nghiên cứu.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng bộ mẫu chuẩn dương tính và âm tính với kháng thể IgM của vi rút

Dengue

Sau khi xác định đặc tính của các mẫu đã thu thập bằng 3 phương pháp (ELISA, SKMD, FIA), số mẫu dương tính với IgM được chọn vào bộ mẫu IgM dương tính là 50 mẫu, trong đó có 39 mẫu dương tính bằng 2 phương pháp ELISA và SKMD, 11 mẫu dương tính bằng 2 phương pháp ELISA và FIA. Số mẫu được chọn vào bộ mẫu IgM âm tính là 50 mẫu, gồm các mẫu âm tính với IgM bằng 2 phương pháp ELISA và SKMD, phù hợp với cỡ mẫu $n=50$ đã được xác định ở phần nội dung nghiên cứu.

Việc sử dụng kết hợp ba phương pháp miễn dịch gắn men, sắc ký miễn dịch, và miễn dịch huỳnh quang đã giúp nâng cao độ chính xác trong xác định và khẳng định đặc tính mẫu, đặc biệt đối với các mẫu có kết quả không đồng nhất giữa các kỹ thuật. Tất cả mẫu được chọn vào bộ mẫu đều được xác nhận dương tính/âm tính nhất quán bằng ít nhất hai trong ba phương pháp trên, đảm bảo độ tin cậy cao.

ELISA là phương pháp được sử dụng làm tham chiếu khi đánh giá các tiêu chí kỹ thuật của các thiết bị y tế chẩn đoán Dengue. Trong một nghiên cứu về hiệu quả chẩn đoán của Dengue FIA SD Biosensor đã chỉ ra độ nhạy và độ đặc hiệu trong phát hiện IgM/IgG của

ELISA cao hơn FIA [17]. Cũng trong nghiên cứu này đã chỉ ra giá trị dự đoán dương tính của FIA cao hơn sắc ký miễn dịch. Nghiên cứu còn cho biết mặc dù 2 phương pháp ELISA và FIA không có sự tương đồng về nồng độ kháng thể đo được do nguyên lý đọc kết quả khác nhau nhưng 2 phương pháp này có sự tương đồng về kết quả dương/âm. Vì vậy, với những mẫu có sự không đồng thuận giữa ELISA và SKMD thì việc sử dụng FIA để xác định đặc tính mẫu đã có căn cứ khoa học.

Kết quả xác định đặc tính mẫu bằng phương pháp ELISA được thể hiện bằng giá trị S/Co - là tỷ số mật độ quang đo được của mẫu và giá trị ngưỡng. Căn cứ vào giá trị S/Co, chia bộ mẫu dương tính IgM thành 3 nhóm: nhóm nồng độ thấp từ 1-2 lần S/Co, nhóm nồng độ trung bình từ 2-3 lần S/Co, nhóm nồng độ cao > 3 lần S/Co với số lượng tương ứng như sau.

Bảng 1. Cơ cấu bộ mẫu IgM dương tính (n=50)

Nhóm mẫu	Giá trị S/Co (1,07 -9,91)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nhóm nồng độ thấp	$1 < S/Co \leq 2$	22	44
Nhóm nồng độ trung bình	$2 < S/Co \leq 3$	12	24
Nhóm nồng độ cao	$S/Co > 3$	16	32

Thiết kế của WHO khi xây dựng bộ mẫu lâm sàng để đánh giá các TBYT chẩn đoán Dengue đã sử dụng ELISA làm phương pháp tham chiếu [10], do đó việc phân chia bộ mẫu dương tính theo 3 dải nồng độ (thấp, trung bình, cao) dựa trên giá trị S/Co của kết quả ELISA trong nghiên cứu này là hợp lý. Nguyên lý đọc kết quả của phương pháp ELISA là hiệu số của tín hiệu mẫu và tín hiệu nền, do đó giá trị đọc được phản ánh sự tương quan tuyến tính với nồng độ của kháng thể trong mẫu phân tích. Giá trị IgM của các mẫu thu thập được phần lớn nằm trong dải thấp ($1 < S/Co < 2$), điều này phù hợp với đặc điểm của kháng thể IgM trong đáp ứng miễn dịch: nồng độ kháng thể IgM thấp trong cả 2 trường hợp nhiễm trùng tiên phát và thứ phát [4]. Việc chia bộ mẫu thành các nhóm thỏa mãn yêu cầu đặt ra với tỷ lệ mẫu nồng độ thấp tối thiểu là 20%, cụ thể, tỷ lệ mẫu nồng độ thấp, trung bình, cao lần lượt là 44%, 24%, 32%.

3.2. Xây dựng bộ mẫu chuẩn dương tính và âm tính với kháng thể IgG của vi rút

Dengue

So với kết quả thu được của nhóm dương tính IgM, thì các mẫu thuộc nhóm dương tính IgG có nồng độ kháng thể trung bình và cao ($S/Co > 2$). Điều này phù hợp với các đặc điểm của kháng thể IgG trong đáp ứng miễn dịch. Trong đáp ứng miễn dịch tiên phát, IgG xuất

hiện sau IgM nhưng nồng độ kháng thể cao hơn. Trong đáp ứng miễn dịch thứ phát, IgG xuất hiện sớm hơn, trước IgM và nồng độ kháng thể lần này cao hơn IgM rất nhiều.

Sau khi xác định đặc tính, các mẫu thu được có kết quả S/Co dao động từ 2,11 đến 15,0 không có mẫu nào có giá trị S/Co dao động từ 1 - 2. Do đó, cần tạo ra các mẫu có kết quả S/Co nằm trong dải từ 1 đến 2 bằng cách pha loãng các mẫu có giá trị cao trong nền mẫu âm tính. Nhóm nghiên cứu chọn 14 mẫu có giá trị S/Co trong dải từ 3-4 để pha trong nền mẫu âm tính với tỷ lệ pha 1/4, gọi là mẫu chế tạo.

Kết quả xác định đặc tính của mẫu chế tạo như sau.

Bảng 2. Kết quả chế tạo mẫu dương tính IgG

Tỷ lệ pha	Số mẫu gốc	Số mẫu chế tạo	
1/4	14	10	Dương tính IgG ($1 < S/Co < 2$)
		2	Dương tính IgG ($S/Co > 2$)
		2	Âm tính IgG ($S/Co < 1$)

Số mẫu chế tạo cho kết quả dương tính với giá trị S/Co nằm trong khoảng từ 1 đến 2 là 10 mẫu. Những mẫu này được xác định đặc tính bằng phương pháp sắc ký miễn dịch và phương pháp miễn dịch huỳnh quang để chọn được những mẫu có kết quả tương đồng dương tính vào bộ mẫu IgG dương tính. Kết quả là không có mẫu nào cho kết quả dương tính bằng 2 phương pháp còn lại. Điều này có thể giải thích do giới hạn phát hiện của các sinh phẩm nhanh có thể chưa phát hiện được kháng thể ở mức nồng độ thấp, gợi ý việc đưa các mẫu này vào bộ mẫu khó để kiểm định độ nhạy của các TBYT có ngưỡng phát hiện thấp.

Kết luận: Bộ mẫu IgG dương tính là 50 mẫu trong đó 46 mẫu dương tính bằng 2 phương pháp ELISA và SKMD, 04 mẫu dương tính bằng 2 phương pháp ELISA và FIA. Bộ mẫu chỉ gồm các mẫu gốc, không có mẫu pha, giá trị S/Co nhỏ nhất là 2,11.

Căn cứ vào giá trị S/Co của mẫu và số lượng mẫu, chia thành 3 nhóm với số lượng tương ứng như sau:

Bảng 3. Cơ cấu bộ mẫu IgG dương tính (n=50)

Nhóm mẫu	Giá trị S/Co (2,11 – 13,25)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nhóm nồng độ thấp	$2 < S/Co \leq 4$	20	40
Nhóm nồng độ trung bình	$4 < S/Co \leq 6$	17	34
Nhóm nồng độ cao	$S/Co > 6$	13	26

Dải giá trị S/Co của IgG phân bố từ 2,11 đến 15,0 mà không bao gồm các giá trị từ 1-2 do đó trong trường hợp này, giá trị S/Co = 2 được coi là giá trị ngưỡng. Vì vậy, sự phân bố

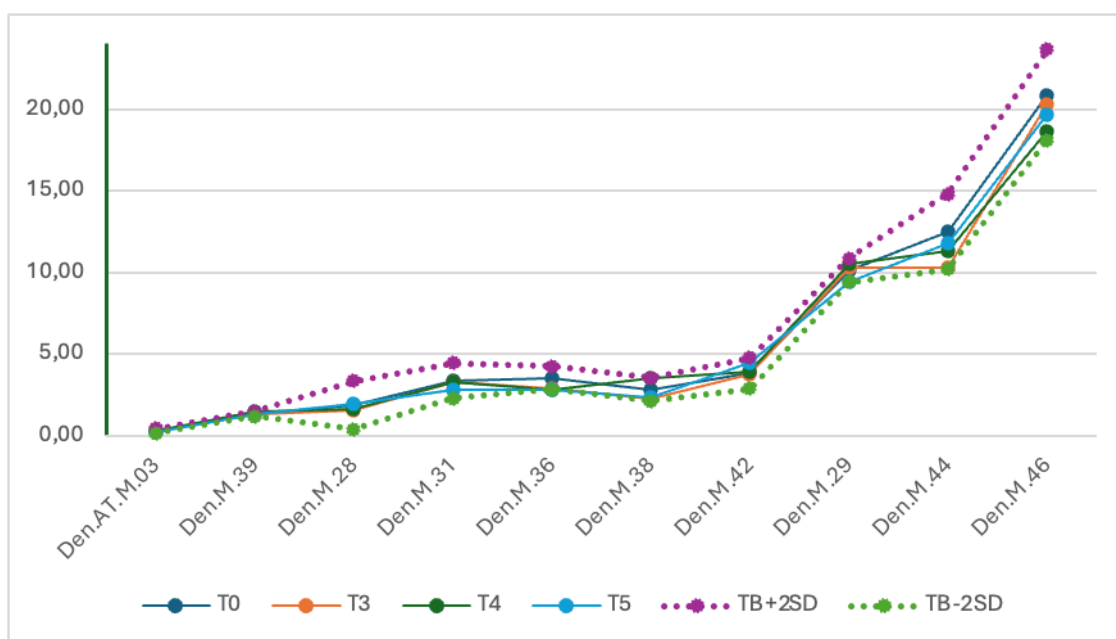
các nhóm nồng độ của bộ mẫu IgG dương tính được chia theo dải thấp ($2 < S/Co < 4$), trung bình ($4 < S/Co < 6$) và cao ($S/Co > 6$) là phù hợp.

Tỷ lệ mẫu nồng độ thấp, trung bình, cao lần lượt là 40%, 34% và 26%, thỏa mãn yêu cầu tỷ lệ tối thiểu mẫu nồng độ thấp là 20% đã đặt ra tại mục nội dung nghiên cứu ở trên.

3.3. Kết quả đánh giá độ ổn định của các bộ mẫu theo số chu kỳ đông băng/tan đông.

Bảng 4. Giá trị COI trung bình của bộ mẫu IgM sau các lần tan đông

Kí hiệu mẫu	Giá trị COI					
	T0	T3	T4	T5	TB+2SD	TB-2SD
Den.AT.M.03	0,29	0,33	0,31	0,26	0,42	0,16
Den.M.39	1,35	1,33	1,50	1,33	1,50	1,20
Den.M.28	1,87	1,53	1,64	1,95	3,34	0,40
Den.M.31	3,37	3,28	3,26	2,82	4,46	2,28
Den.M.36	3,56	2,87	2,85	2,86	4,27	2,85
Den.M.38	2,84	2,29	3,56	2,35	3,55	2,13
Den.M.42	3,82	3,74	3,93	4,46	4,77	2,86
Den.M.29	10,15	10,31	10,50	9,43	10,88	9,43
Den.M.44	12,52	10,30	11,33	11,81	14,82	10,22
Den.M.46	20,88	20,27	18,65	19,66	23,66	18,10
p = 0,29						

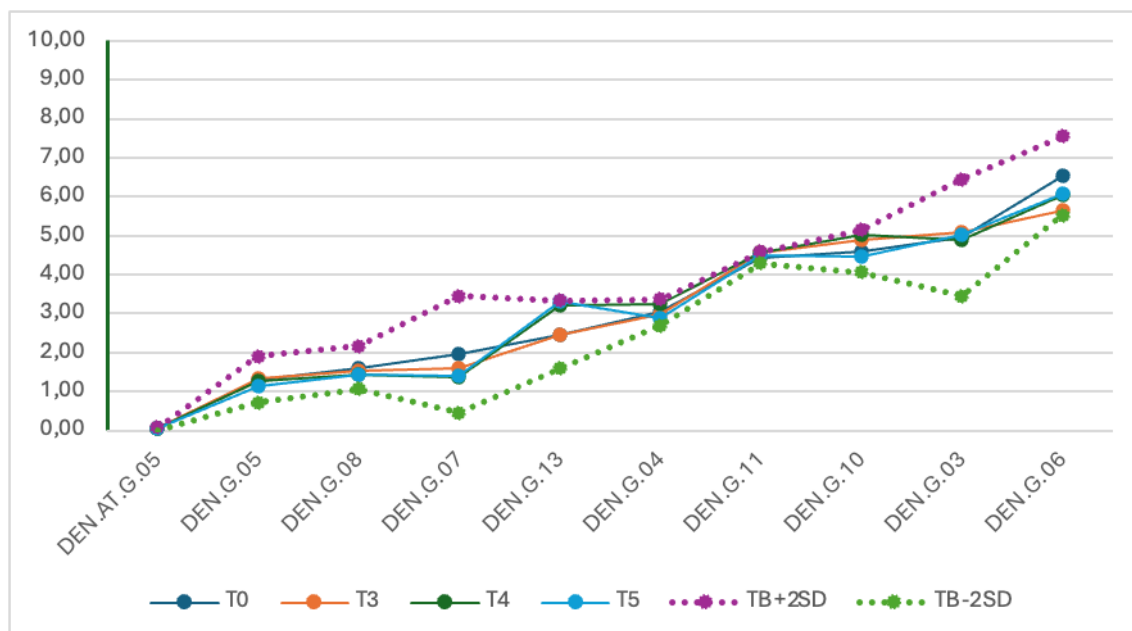


Hình 1. Biểu đồ sự dao động giá trị COI của bộ mẫu IgM sau các lần tan đông

Phân tích số liệu cho thấy có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa giá trị COI của 05 lần tan băng so với thời điểm t0 với giá trị p là 0,29. Sự dao động của các giá trị đều nằm trong khoảng $\pm 2SD$.

Bảng 5. Giá trị COI trung bình của bộ mẫu IgG sau các lần tan đông

Kí hiệu mẫu	Giá trị COI					
	T0	T3	T4	T5	TB+2SD	TB-2SD
DEN.AT.G.05	0,04	0,04	0,06	0,04	0,08	0,00
DEN.G.05	1,32	1,32	1,28	1,13	1,91	0,72
DEN.G.08	1,62	1,55	1,44	1,45	2,18	1,06
DEN.G.07	1,95	1,59	1,38	1,39	3,44	0,46
DEN.G.13	2,47	2,45	3,21	3,30	3,34	1,59
DEN.G.04	3,03	3,00	3,23	2,87	3,37	2,69
DEN.G.11	4,44	4,58	4,58	4,49	4,59	4,29
DEN.G.10	4,60	4,89	5,04	4,48	5,14	4,06
DEN.G.03	4,95	5,10	4,88	5,04	6,45	3,45
DEN.G.06	6,54	5,65	6,03	6,09	7,56	5,53
p = 0,682						



Hình 2. Biểu đồ sự dao động giá trị COI của bộ mẫu IgG sau các lần tan đông

Phân tích số liệu cho thấy không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa giá trị COI của lần thứ 05 tan băng và thời điểm 0 ở cả hai bộ mẫu đánh giá độ ổn định với $p = 0,68$. Sự dao động của các giá trị đều nằm trong khoảng $\pm 2SD$.

Huyết thanh/ huyết tương bảo quản ở nhiệt độ $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Độ ổn định của kháng thể ở các điều kiện bảo quản đã được công bố trong nhiều nghiên cứu. Kháng thể kháng viêm gan A ổn định khoảng 2,5 năm điều kiện bảo quản -20°C ; vài năm ở -65°C [18]. Với thể tích mẫu chuẩn là $550\mu\text{l}/1$ mẫu, thể tích mẫu mỗi lần xét nghiệm là $10\mu\text{l}$ đến $50\mu\text{l}$ tùy theo quy trình xét nghiệm của từng loại thiết bị chẩn đoán thì bộ mẫu sẽ kiểm định được khoảng 10-20 bộ thiết bị chẩn đoán. Nhu cầu kiểm định thiết bị chẩn đoán chẩn đoán Dengue hàng năm khoảng 10 bộ bao gồm cả tiền kiểm và hậu kiểm. Với lượng thể tích có được, bộ mẫu này sẽ đáp ứng nhu cầu kiểm định trong khoảng 2 năm. Nhóm nghiên cứu không đánh giá độ ổn định theo thời gian ở nhiệt độ bảo quản mà đánh giá độ ổn định của bộ mẫu sau các chu kỳ đông băng/ tan đông nhằm đáp ứng nhu cầu thực tiễn trong việc sử dụng bộ mẫu.

Việc bảo quản và rã đông huyết thanh/ huyết tương được thực hiện theo nhiều hướng dẫn chung. Hướng dẫn Quốc gia về xét nghiệm huyết thanh học HIV hướng dẫn không rã đông huyết thanh/ huyết tương quá 3 lần [19]. Tuy nhiên cũng có nhiều nghiên cứu cho thấy việc rã đông nhiều hơn 3 lần vẫn đảm bảo độ ổn định của kháng thể trong huyết thanh/ huyết tương [20,21]. Với thể tích mẫu mỗi lần xét nghiệm là $10\mu\text{l}$ đến $50\mu\text{l}$ tùy theo hướng dẫn sử dụng của từng loại TBYT, thể tích mẫu thu được khoảng $550\mu\text{l}$ mà không được rã đông quá 3 lần theo các hướng dẫn chung thì phải sử dụng rất nhiều tuýp để chứa mẫu. Nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá độ ổn định của bộ mẫu theo số chu kỳ đông băng/tan đông với kỳ vọng sau 6 lần tan đông mà đặc tính mẫu không thay đổi sẽ làm giảm số lượng tuýp chứa mẫu, tiết kiệm kinh phí và diện tích tủ bảo quản mẫu. Kết quả đánh giá độ ổn định của các bộ mẫu qua các chu kỳ đông băng/tan đông cho thấy giá trị trung bình và hệ số biến thiên của các mẫu ở các thời điểm là ổn định. Giá trị $p = 0,29$ (đối với bộ IgM) và $p = 0,682$ (đối với bộ IgG) trong phép so sánh các giá trị trung bình giữa các lần đông băng/tan đông cho thấy có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với thời điểm t_0 . Điều này chứng tỏ bộ mẫu ổn định qua các chu kỳ đông băng/ tan đông (6 chu kỳ).

Kết quả nghiên cứu độ ổn định của bộ mẫu theo thiết kế này phù hợp với kết quả của Joanna Siennicka và cộng sự khi đánh giá ảnh hưởng của việc lặp lại các chu kỳ rã đông và đông băng đối với sự ổn định của kháng thể IgG và IgM trong mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể chống Cytomegalovirus rút và vi rút sởi (IgG và/hoặc IgM). Các mẫu huyết thanh trong nghiên cứu này trải qua từ 1 đến 10 chu kỳ rã đông và đông băng ở -20°C . Sự hiện diện

của kháng thể được kiểm tra bằng các bộ xét nghiệm ELISA thương mại. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu vẫn dương tính ngay cả sau khi lặp lại 10 chu kỳ rã đông và đông lạnh [20].

Kết quả này cũng phù hợp với kết quả đánh giá ảnh hưởng của việc lặp lại các chu kỳ rã đông/đông lạnh đến độ ổn định của kháng thể HIV trong mẫu huyết thanh được đăng trên tạp chí *Journal of Virological Methods*. Các mẫu huyết thanh chứa kháng thể HIV không có sự mất hoạt tính của kháng thể hoặc không có kết quả dương tính giả nào được ghi nhận sau 20 chu kỳ rã đông/đông lạnh ở -20 °C [21].

3.4. Tiêu chuẩn của các bộ mẫu chuẩn

3.4.1. Tiêu chuẩn của bộ mẫu chuẩn IgM

Bảng 6. Tiêu chuẩn bộ mẫu Dengue IgM dương tính

STT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn
1	Số lượng và đóng gói	Đếm và quan sát	Bộ mẫu gồm 50 mẫu thành viên. Mỗi mẫu đựng trong 2 tuýp riêng biệt (tuýp nhựa vô trùng 1ml). Bên ngoài mỗi tuýp có ký hiệu tên của từng mẫu. 50 mẫu được xếp trong 2 hộp nhựa có nắp, bên ngoài có dán nhãn.
2	Cảm quan	Mắt thường	Dung dịch huyết tương màu vàng nhạt đến vàng đậm (tùy từng mẫu)
3	Nhận dạng	ELISA	100% mẫu dương tính với kháng thể Dengue IgM
4	Độ ổn định	FIA	Bộ mẫu ổn định sau 6 lần tan đông

Bảng 7. Tiêu chuẩn bộ mẫu Dengue IgM âm tính

STT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn
1	Số lượng và đóng gói	Đếm và quan sát	Bộ mẫu gồm 50 mẫu thành viên. Mỗi mẫu đựng trong 2 tuýp riêng biệt (tuýp nhựa vô trùng 1ml). Bên ngoài mỗi tuýp có ký hiệu tên của từng mẫu. 50 mẫu được xếp trong 2 hộp nhựa có nắp, bên ngoài có dán nhãn.
2	Cảm quan	Mắt thường	Dung dịch huyết tương màu vàng nhạt đến vàng đậm (tùy từng mẫu)
3	Nhận dạng	ELISA	100% mẫu âm tính với kháng thể Dengue IgM
4	Độ ổn định	FIA	Bộ mẫu ổn định sau 6 lần tan đông

3.4.2. Tiêu chuẩn bộ mẫu chuẩn Dengue IgG

Bảng 8. Tiêu chuẩn bộ mẫu Dengue IgG dương tính

STT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn
1	Số lượng và đóng gói	Đếm và quan sát	Bộ mẫu gồm 50 mẫu thành viên. Mỗi mẫu đựng trong 2 tuýp riêng biệt (tuýp nhựa vô trùng 1ml). Bên ngoài mỗi tuýp có ký hiệu tên của từng mẫu. 50 mẫu được xếp trong 2 hộp nhựa có nắp, bên ngoài có dán nhãn.
2	Cảm quan	Mắt thường	Dung dịch huyết tương màu vàng nhạt đến vàng đậm (tùy từng mẫu)
3	Nhận dạng	ELISA	100% mẫu dương tính với kháng thể Dengue IgG
4	Độ ổn định	FIA	Bộ mẫu ổn định sau 6 lần tan đông

Bảng 9. Tiêu chuẩn bộ mẫu Dengue IgG âm tính

STT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn
1	Số lượng và đóng gói	Đếm và quan sát	Bộ mẫu gồm 50 mẫu thành viên. Mỗi mẫu đựng trong 2 tuýp riêng biệt (tuýp nhựa vô trùng 1ml). Bên ngoài mỗi tuýp có ký hiệu tên của từng mẫu. 50 mẫu được xếp trong 2 hộp nhựa có nắp, bên ngoài có dán nhãn.
2	Cảm quan	Mắt thường	Dung dịch huyết tương màu vàng nhạt đến vàng đậm (tùy từng mẫu)
3	Nhận dạng	ELISA	100% mẫu âm tính với kháng thể Dengue IgG
4	Độ ổn định	FIA	Bộ mẫu ổn định sau 6 lần tan đông

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập thành công 4 bộ mẫu bao gồm Bộ mẫu chuẩn dương tính và âm tính với kháng thể IgM của vi rút Dengue, mỗi bộ gồm 50 thành viên, có kết quả xác định đặc tính bằng các phương pháp tham chiếu là phương pháp ELISA, bảo quản ở -70°C có độ ổn định sau 6 lần tan đông và Bộ mẫu chuẩn dương tính và âm tính với kháng thể IgG của vi rút

Dengue, mỗi bộ gồm 50 thành viên, có kết quả xác định đặc tính bằng các phương pháp tham chiếu là phương pháp ELISA, bảo quản ở -70 °C có độ ổn định sau 6 lần tan đông. Các bộ mẫu chuẩn này có thể sử dụng trong kiểm định tiền kiểm và hậu kiểm thiết bị y tế phát hiện kháng thể đặc hiệu IgM và IgG của vi rút Dengue.

Tài liệu tham khảo

- [1] Roy SK, Bhattacharjee S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Can J Microbiol.* 2021;67(10):687–702.
- [2] Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008; 11(4):369–77.
- [3] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504–507.
- [4] Muller DA, Depelsenaire AC, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis.* 2017;215(suppl_2):S89–S95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28403441>
- [5] Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005;38(1):5–16.
- [6] Lima MRQ, Nunes PCG, Dos Santos FB. Serological Diagnosis of Dengue. *Methods Mol Biol.* 2022;2409:173–196.
- [7] World Health Organization. *WHO guidelines on evaluation of in vitro diagnostics.* Geneva: WHO; 2021.
- [8] European Commission. *Commission Implementing Regulation (EU) 2022/1107.* [Internet]. 2022 [cited 2024 Oct]. Available from: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2022/1107
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline – Second Edition.* CLSI document EP12-A2. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- [10] World Health Organization. *Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests.* Dengue Evaluation Series No.3. Geneva: WHO; 2009.
- [11] SeraCare. *Data sheet AccuSet Dengue Mixed Titer Performance Panel 0845-0243/ Batch #10688198.* Milford, MA: SeraCare Life Sciences; 2024.
- [12] Diapro Diagnostic Bioprobes. *Hướng dẫn sử dụng sinh phẩm Dengue virus IgM.* Italy: Diapro.

[13] SD Biosensor. *Hướng dẫn sử dụng khay thử xét nghiệm định tính kháng thể IgM, IgG kháng vi rút Dengue*. Hàn Quốc: SD Biosensor.

[14] SD Biosensor. *Hướng dẫn sử dụng sinh phẩm xét nghiệm Dengue IgM/IgG FIA*. Hàn Quốc: SD Biosensor.

[15] U.S. Food and Drug Administration. *Policy for Coronavirus Disease-2019 Tests During the Public Health Emergency (Revised)*. [Internet]. Silver Spring (MD): FDA; 2021 [cited 2024 Oct]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/policy-coronavirus-disease-2019-tests-during-public-health-emergency-revised>

[16] European Medicines Agency. *Guideline on bioanalytical method validation*. [Internet]. London: EMA; 2012 [cited 2024 Oct]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

[17] Ruchusatsawat K, Benjamungkalarak T, Phunikom N, et al. A performance comparison between fluorescent immunoassay and immunochromatography for rapid dengue detection in clinical specimens. *Sci Rep*. 2022;12(1):17299.

[18] Hendriks J, Stals C, Versteilen A, et al. Stability studies of binding and functional anti-vaccine antibodies. *Bioanalysis*. 2014;6(10):1385–1393.

[19] Bộ Y tế. *Quyết định số 1098/QĐ-BYT về việc ban hành hướng dẫn quốc gia về xét nghiệm huyết thanh học HIV*. Hà Nội: Bộ Y tế; 2013.

[20] Siennicka J, Laskowska A, Trzcińska A. Evaluating of influence of repeated thaw/freeze cycles on IgG and IgM stability. *Med Dosw Mikrobiol*. 2010;62(3):281–283.

[21] Fipps DR, Damato JJ, Brandt B, Burke DS. Effects of multiple freeze thaws and various temperatures on the reactivity of human immunodeficiency virus antibody using three detection assays. *J Virol Methods*. 1988;20(2):127–132.