

Research Paper

Validation study of a quantitative ELISA assay to determine the potency of human immunoglobulin containing antibody to hepatitis B surface antigen

Tran Thi Trang Huyen*, Vu Thi Thu Huong, Nguyen Thi Tuong An, Pham Thi Minh, Cao Thi Van, Vu Thi Phuong

National Institute for Control of Vaccine and Biologicals, No 1 Nghiem Xuan Yem, Hoang Mai, Ha Noi

Received 3/2/2022

Accepted 20/3/2022

Abstract

Background/Purpose: The quantitative ELISA method is a fast and accurate method. The advantages of this method include long shelf life of test kit, simple procedure and cost effectiveness. This study was conducted to validate the application of a quantitative ELISA assay and determine if this technique is suitable for quality control of human immunoglobulin products containing antibody to hepatitis B surface antigen.

Methods: descriptive laboratory study. We explored the technical specifications of a commercial quantitative ELISA assay for the determination of anti-HBs antibodies. They included linearity, limit of quantitation, trueness, precision and robustness of the ELISA kit. This commercial quantitative ELISA kit has been approved by the European Regulatory Authority.

Results: Our results included as follow: for the linearity of the ELISA assay, the correlation coefficient (R) was 0.99 with CV 1.57%, showing a strong relationship between anti-HBs concentration and OD; limit of quantitation (LoQ) was 36,68 (IU/ml), CV of intra-run and inter-run precision were 3.98% and 4-6%, respectively. Results of trueness and robustness showed $t < t_{\alpha}$. All of the technical specifications of the ELISA assay were passed for quality requirements and suitable for use to determine the potency of the ImmunoHBs 180IU/ml product.

Conclusion: Quantitative ELISA method is a suitable immuno method to determine the titer of anti-HBs in ImmunoHBs 180IU/ml and can be used as a potency test for quality control of human immunoglobulin containing antibody to hepatitis B surface antigen.

Keywords: ELISA, Hepatitis B virus, anti-HBs

Nghiên cứu áp dụng kỹ thuật ELISA định lượng cho kiểm định công hiệu sinh phẩm huyết thanh chứa kháng thể đặc hiệu kháng HBs của vi rút viêm gan B

Trần Thị Trang Huyền*, Vũ Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Tường An, Phạm Thị Minh, Cao Thị Vân, Vũ Thị Phượng

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, Số 1 Nghiêm Xuân Yên, Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội

Nhận ngày 3 tháng 2 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 20 tháng 3 năm 2022

Tóm tắt

Đặt vấn đề/ Mục tiêu: 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. Nghiên cứu này thực hiện để nhằm xác định sự phù hợp của quy trình 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.

Phương pháp: Mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm

Kết quả: Chúng tôi đã khảo sát các tiêu chí kỹ thuật của quy trình ELISA định lượng xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs bao gồm độ tuyến tính, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác và độ mạnh sử dụng bộ kit ELISA định lượng thương mại đã được Cơ quan quản lý Châu Âu cấp phép. Các tiêu chí đều đạt các tiêu chuẩn chấp thuận và phù hợp để sử dụng cho kiểm định công hiệu của sản phẩm Immuno HBs 180-200 IU/ml.

Kết luận: Phần lớn trẻ viêm phổi tái diễn nặng bị nhiễm vi khuẩn. Gần một nửa trong số đó có nhiễm virus. Các tác nhân thường gặp gây viêm phổi tái diễn là H. influenzae, S.pneumoniae, Adenovirus.

Từ khóa: phương pháp ELISA, viêm gan B, sinh phẩm.

* Corresponding author.

E-mail address: trantranghuyen@nicvb.org.vn

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i1.15>

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. 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 nội chuẩn và thẩm định để định lượng kháng thể (Dược điển Châu Âu, Dược điển Mỹ).

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. 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. Đối tượng nghiên cứu

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu:

Khoa Kiểm định Sinh phẩm y tế, 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.

2.3.2. Thiết bị và dụng cụ

Dàn 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.

Tóm tắt quy trình thử nghiệm

Nhỏ 50 µl dung dịch pha loãng mẫu (DILSPE) **trừ giếng trắng**



Nhỏ 100 µl chất hiệu chuẩn (CAL)



Nhỏ 100 µl mẫu thử đã pha loãng n lần*



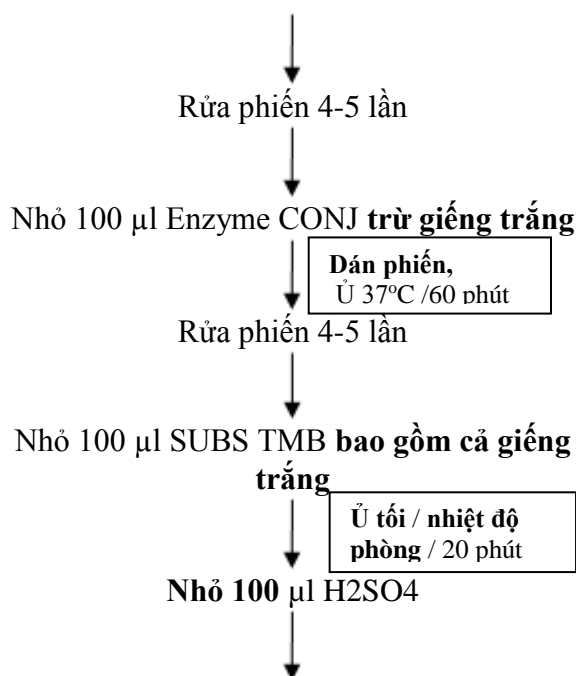
Nhỏ 100 µl huyết thanh chứng(CONTROL)

Dán phiến,
Ủ 37°C /60 phút

*Tác giả liên hệ.

E-mail address: trantranhuyen@nicvb.org.vn

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i1.15>



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%.

2.4. Đánh giá các tiêu chí kỹ thuật của phương pháp ELISA định lượng khi áp dụng trên mẫu huyết thanh người chứa kháng thể viêm gan B.

a) 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 dự kiến pha phải nằm trong dải nồng độ của các chất hiệu chuẩn của kit. Chọn nồng độ mẫu chuẩn dựng

đường chuẩn là 167IU/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

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 $RSD \leq 20\%$

b) 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

c) 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 sau:

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: $T < t_{\alpha}$.

d) 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 sau:

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%

e) Độ mạnh:

- 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 $\alpha = 0,05$, tức với độ tin cậy 95%.

+ CV < 20%.

3. Kết quả

3.1. Độ tuyến tính

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.

Ngày thực hiện	Phương trình đường chuẩn	Hệ số hồi quy tuyến tính	Kết quả mẫu thử
14/9/2021	$y = -1,821E-05x^2 + 0,0159111x + 0,0592869$	$R^2 = 1$	56,23 IU/ml
15/9/2021	$y = -3.14918E-05x^2 + 0.0249599x + 0.0688$	$R^2 = 0,999$	55,88 IU/ml
16/9/2021	$y = -1,2634E-05x^2 + 0,00650216x + 0,115277$	$R^2 = 0,988$	54,85 IU/ml
21/9/2021	$y = -2,821E-05x^2 + 0,0159111x + 0,0592869$	$R^2 = 1$	56,23 IU/ml
22/9/2021	$y = -1,58006E-05x^2 + 0,0157397x + 0,0588867$	$R^2 = 1$	55,8 IU/ml
23/9/2021	$y = -2.65533E-05x^2 + 0.0210124x + 0.1152$	$R^2 = 0,988$	54,05 IU/ml
Trung bình mẫu thử			55,51 IU/ml
SD			0,87 IU/ml
CV			1,57 IU/ml

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. Giới hạn định lượng (LOQ)

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. Độ đúng

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 (Bx2000/1000) IU/ml	Lần TN	Kết quả (IU/L) (C)	Nồng độ quy đổi (Cx1000/1000) IU/ml
1	20,23	101,127	1	50,13	100,260	1	110,70	110,70
2	20,13	100,648	2	49,35	98,693	2	106,63	106,63
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 $t < t_{\alpha}$. *Đổi chiếu với tiêu chuẩn chấp thuận:* $t < t_{\alpha}$, có thể kết luận quy trình quy trình ELISA định lượng này đạt về độ đúng.

3.4. Độ chính xác

a) Độ lặp lại

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 lặp lại	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			

Đôi 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.

b) Độ chính xác trung gian

Bảng 5: Tổng hợp kết quả nhóm 1

Lần lặp lại	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 2

Lần lặp lại	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 chúng 2 nhóm

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			
	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			

Đôi 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

3.5. Độ mạnh:

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

Nhóm	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 tính toán $T_{\text{test}} = 0,46$, 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. Bàn luận

Huyết thanh chứa kháng thể đặc hiệu kháng HBs của virus viêm gan B (Immuno HBs) là một loại sinh phẩm điều trị giúp dự phòng và điều trị viêm gan B cho nhóm đối tượng nguy cơ cao bao gồm trẻ sinh ra từ bà mẹ nhiễm virus viêm gan B, người suy giảm miễn dịch, người có bệnh lý nền mạn tính và người thường xuyên tiếp xúc với nguồn lây nhiễm mà kém đáp ứng với vắc xin phòng bệnh,... 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) là tiêu chí kỹ thuật quan trọng giúp cơ quan quản lý kiểm soát chất lượng sản phẩm trước và sau khi cấp số lưu hành sản phẩm. Trong các phương pháp xác định công hiệu của sản phẩm, các phương pháp miễn dịch học như miễn dịch gắn men (ELISA) là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện, ít tốn kém, có độ chính xác, độ chụm cao, ít gây sai lệch quả giữa các lần thử nghiệm và giữa các labo thực hiện thử nghiệm nên phù hợp với mục đích kiểm định [2].

Chúng tôi đã khảo sát các tiêu chí kỹ thuật của quy trình trình ELISA định lượng xác định hàm lượng kháng thể anti-HBs bao gồm độ tuyến tính, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác và độ mạnh sử dụng bộ kit ELISA định lượng thương mại đã được Cơ

quan quản lý Châu Âu cấp phép. Kết quả nghiên cứu cho thấy quy trình ELISA định lượng sử dụng trong nghiên cứu này có hệ số tuyến tính trung bình (R) là 0,99, CV 1,57% nên 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. Giới hạn định lượng (LOQ) là 36,681 (IU/ml). Kết quả độ lặp lại có CV là 3,98%, độ chính xác trung gian có CV từ 4-6%. Kết quả độ đúng và độ mạnh đều có $t < t_{\alpha}$. Các tiêu chí đều đạt các tiêu chuẩn chấp thuận và phù hợp để sử dụng cho kiểm định công hiệu của sản phẩm ImmunoHBs 180IU/ml.

Kết quả nghiên cứu này là bằng chứng khoa học cho thấy ELISA là phương pháp miễn dịch phù hợp sử dụng kiểm định công hiệu cho dòng sản phẩm huyết thanh chứa kháng thể đặc hiệu kháng HBs của virus viêm gan B tại khoa Kiểm định Sinh phẩm Y tế, Viện Kiểm Định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, Việt Nam. Kỹ thuật ELISA sử dụng trong nghiên cứu này có độ chính xác, độ chụm, và độ ổn định cao, hệ số biến thiên (CV) khi đánh giá các tiêu chí kỹ thuật là rất nhỏ ($\leq 5\%$). Trong khi, một số nhà sản xuất và một số labo kiểm định, vẫn cho phép hệ số biến thiên của kỹ thuật ELISA dao động đến 20%. Kết quả cho thấy việc kiểm soát các thành tố ảnh hưởng kết quả bao gồm mức độ thành thạo của nhân viên

kỹ thuật, hiệu chuẩn/ kiểm chuẩn của trang thiết bị máy móc dụng cụ và hóa chất sinh phẩm là rất tốt. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi là rất ý nghĩa và bổ sung thêm bằng chứng cho việc khuyến cáo sử dụng kỹ thuật invitro có độ chính xác và độ ổn định cao, thay thế dần và giảm thiểu các kỹ thuật invitro trên động vật thí nghiệm theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới.

5. Kết luận

Các kết quả trong 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 tiêu chuẩn về độ tuyến tính, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian), độ

manh để sử dụng cho kiểm định công hiệu của sản phẩm Immuno HBs chứa 180-200IU kháng thể anti-HBs.

References

- [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.