ESTABLISHMENT OF AN ANTI-HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (ANTI-HBS) ANTIBODY REFERENCE PANEL FOR QUALITY ASSESSMENT OF IN VITRO RAPID DIAGNOSTIC DEVICES

Le Thi Hoa, Ngo Phi Phuong, Phung Thị Ngoc, Tran Thi Trang Huyen, Pham Trung Duc, Vu Thi Thu Huong*

National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

Received 09 September 2026

Accepted 30 September 2026

Abstract: Currently, numerous rapid diagnostic devices for the detection of antibodies against hepatitis B surface antigen (anti-HBs) are widely used worldwide and in Vietnam. Quality assessment of these devices requires a reference panel comprising negative and positive samples representative of different levels of assay response. According to the principles for evaluating the performance of in vitro diagnostic (IVD) devices recommended by the European Medicines Agency (EMA) and the CLSI EP12-A2 guideline for qualitative assays, the reference panel should ensure adequate representativeness and an appropriate sample size for the assessment of relevant performance characteristics. Accordingly, the study team selected a reference panel consisting of 50 anti-HBs-negative samples and 50 anti-HBs-positive samples, with the positive samples representing three levels: high, medium, and low. A total of 150 retrospective serum samples collected from a ministerial-level scientific and technological research project on hepatitis B were screened. Screening by immunochromatographic assay and ELISA identified 52 anti-HBs-negative and 87 anti-HBs-positive samples. From these samples, the study group selected 50 anti-HBs-negative and 50 anti-HBs-positive samples to establish the reference panel. The resulting reference panel met the requirements for use in the quality assessment of rapid diagnostic devices for anti-HBs detection.

Keywords: *Reference panel; hepatitis B antibodies; serum.*

* Corresponding author:
E-mail address: huongvu.nicvb@gmail.com
Https://doi.org/10.56086/jcvb.v6i3.269

XÂY DỰNG BỘ MẪU CHUẨN KHÁNG THỂ KHÁNG KHÁNG NGUYÊN BỀ MẶT VI RÚT VIÊM GAN B PHỤC VỤ KIỂM ĐỊNH CHẤT LƯỢNG THIẾT BỊ CHẨN ĐOÁN NHANH IN VITRO

Lê Thị Hòa, Ngô Phi Phương, Phùng Thị Ngọc, Trần Thị Trang Huyền, Phạm Trung Đức, Vũ Thị Thu Hường*

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

Nhận ngày 09 tháng 09 năm 2026

Chấp nhận đăng ngày 30 tháng 09 năm 2026

Tóm tắt: Hiện nay, nhiều thiết bị chẩn đoán nhanh phát hiện kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt vi rút viêm gan B (anti-HBs) được sử dụng rộng rãi trên thế giới và tại Việt Nam. Đánh giá chất lượng các thiết bị này cần bộ mẫu chuẩn gồm mẫu âm tính và dương tính, đại diện cho các mức đáp ứng của xét nghiệm. Theo nguyên tắc đánh giá hiệu năng thiết bị chẩn đoán in vitro của EMA và hướng dẫn CLSI EP12-A2 đối với xét nghiệm định tính, bộ mẫu cần bảo đảm tính đại diện và số lượng phù hợp để đánh giá các chỉ tiêu hiệu năng. Trên cơ sở đó, nhóm nghiên cứu lựa chọn xây dựng bộ mẫu chuẩn gồm 50 mẫu âm tính và 50 mẫu dương tính với anti-HBs, trong đó mẫu dương tính gồm ba mức: cao, trung bình và thấp. Từ 150 mẫu huyết thanh hồi cứu thu thập trong đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ về viêm gan B, kết quả sàng lọc bằng sắc ký miễn dịch và ELISA xác định 52 mẫu âm tính và 87 mẫu dương tính với anti-HBs. Nhóm nghiên cứu đã lựa chọn 50 mẫu âm tính và 50 mẫu dương tính để xây dựng bộ mẫu chuẩn, đáp ứng yêu cầu của mẫu chuẩn có thể sử dụng cho đánh giá chất lượng các thiết bị chẩn đoán nhanh phát hiện anti-HBs.

***Từ khóa**: mẫu chuẩn; kháng thể viêm gan B; huyết thanh.*

1. Đặt vấn đề

Viêm gan B là một bệnh do vi rút viêm gan B (HBV) gây ra, có thể ảnh hưởng đến mọi người ở mọi lứa tuổi. HBV thường lây lan giữa những người trưởng thành thông qua quan hệ tình dục, dùng chung kim tiêm và các dụng cụ ma túy khác, hoặc lây truyền từ mẹ sang con trong quá trình sinh sản. Theo Tổ chức Y tế Thế giới năm 2022 có khoảng 254 triệu người đang sống chung với bệnh viêm gan B mãn tính vào năm 2022, với 1,2 triệu ca nhiễm mới mỗi năm. Năm 2022, viêm gan B gây ra khoảng 1,1 triệu ca tử vong, chủ yếu là do xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan (ung thư gan nguyên phát) [1,2]. HBV có thể được phòng ngừa bằng vắc-xin được đánh giá là biện pháp an toàn và hiệu quả. Việc xác định kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt vi rút viêm gan B (anti-HBs) có tồn tại trong cơ thể hay không thường được xét nghiệm sử dụng các thiết bị y tế chẩn đoán đặc hiệu (IVDs). Hiện nay IVDs phát hiện anti-HBs có nhiều chủng loại đang lưu hành trên thị trường thế giới và Việt Nam. Trong đó xét nghiệm phát hiện anti-HBs sử dụng phương pháp sắc ký miễn dịch được

xem là một phương pháp sàng lọc nhanh, đơn giản và chi phí thấp.

Việc đánh giá được chất lượng của IVDs lưu hành trên thị trường đòi hỏi cần sẵn có các mẫu chuẩn phù hợp. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) mỗi phòng thí nghiệm quốc gia cần thiết lập bộ mẫu chuẩn để chủ động trong công tác kiểm định [3].

Do đó nhóm nghiên cứu đã thực hiện đề tài: "Xây dựng bộ mẫu chuẩn kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt vi rút viêm gan B phục vụ kiểm định chất lượng thiết bị chẩn đoán nhanh *in vitro*" với mục tiêu xây dựng bộ chuẩn âm tính, dương với anti-HBs và đánh giá độ ổn định bộ mẫu chuẩn âm tính, dương tính anti-HBs.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu là mẫu huyết thanh

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu:

Từ 08/2024 đến 07/2025 tại khoa Kiểm định Sinh phẩm y tế, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

2.3. Trang thiết bị , vật tư, hóa chất:

- Pipet man hãng Gilson, Micropipet hãng Eppendorf; máy lắc tuýp-Stuart Scientific; máy lắc phiến-Thermo Fisher; máy ly tâm-Hettich-Đức, tủ cấy vô trùng-Nuaire- Pháp, tủ lạnh bảo quản mẫu-Hitachi-Nhật, tủ âm-Sanyo-Nhật, hệ thống ELISA hãng Thermo Fisher đã được hiệu chuẩn, thẩm định và bảo dưỡng.

- Đầu côn 100, 200, 500 µl; bình định mức 1000 ml; ống đong 500 ml - Việt Nam.

- Bộ kit ELISA HBsAb Dia.Pro-Italy; Bộ kit Genbody Anti-HBs-Hàn Quốc.

2.4. Thiết kế nghiên cứu:

Mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.5. Phương pháp nghiên cứu:

2.5.1. Cỡ mẫu nghiên cứu

Theo hướng dẫn chung EMA, bộ mẫu chuẩn huyết thanh cho đánh giá chất lượng độ nhạy và độ đặc hiệu của các IVDs xét nghiệm chẩn đoán cần đại diện cho quần thể bệnh nhân mục tiêu và đảm bảo độ đa dạng về kiểu huyết thanh cũng như mức tải lượng kháng thể. Bộ mẫu dương tính, âm tính nên cần bao gồm ít nhất 50 mẫu dương tính, 50 mẫu âm tính với anti-HBs đã được khẳng định đặc tính, đảm bảo tính đại diện và độ tin cậy của kết quả. Để khả năng đạt được 2 mục tiêu đề ra (sản xuất và đánh giá tính ổn định của 2 bộ mẫu chuẩn), số lượng mẫu huyết thanh lâm sàng chúng tôi dự kiến thu thập ban đầu là: 150 mẫu.

2.5.2. Thu thập mẫu nghiên cứu

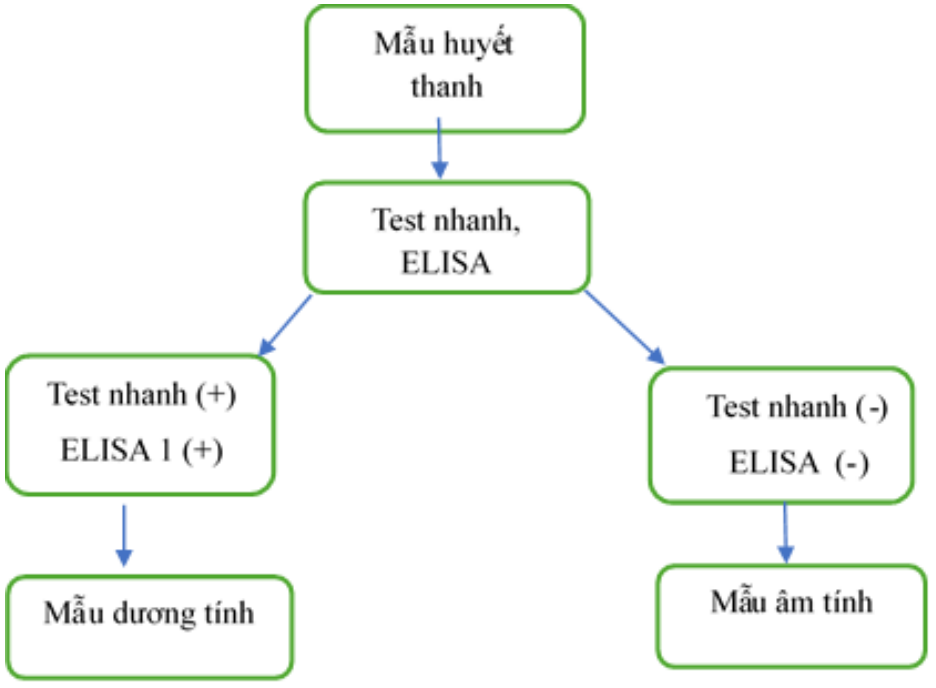
Mẫu nghiên cứu sử dụng trong đề tài là các mẫu huyết thanh còn dư sau khi hoàn thành các nghiên cứu của đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ về viêm gan B.

2.5.3. Sàng lọc mẫu

Trước khi đưa vào nghiên cứu, các mẫu được kiểm tra cảm quan để lựa chọn các mẫu huyết thanh từ nguồn mẫu còn dư đáp ứng các tiêu chí về thể tích, không có các dấu hiệu ảnh hưởng đến chất lượng mẫu như tan huyết, vẩn đục hoặc nhiễm bẩn, phù hợp phục vụ xây dựng bộ mẫu chuẩn.

2.5.4. Xác định đặc tính mẫu bằng hai phương pháp test nhanh và ELISA

Mẫu huyết thanh được lựa chọn và xác định đặc tính theo sơ đồ sau:



Sơ đồ 1. Sơ đồ xác định đặc tính mẫu

2.5.5. Xây dựng bộ mẫu chuẩn

- Bộ mẫu chuẩn âm tính: 50 mẫu đã xác định âm tính với anti-HBs được chia nhỏ vào các ống dùng để xây dựng bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu với số lượng 01 bộ bao gồm 50 mẫu âm tính với Anti-HBs .

- Bộ mẫu chuẩn dương tính: 50 mẫu đã xác định dương tính với anti-HBs được chia nhỏ vào các ống dùng để xây dựng bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy với số lượng 01 bộ bao gồm 50 mẫu dương tính với Anti-HBs được phân thành 03 mức cao, trung bình, thấp.

2.5.6. Tiêu chí lựa chọn bộ mẫu chuẩn

Bộ mẫu chuẩn được lựa chọn thông qua các chỉ số về cảm quan, nhận dạng, số lượng:

Bảng 1. Tiêu chí lựa chọn của bộ mẫu chuẩn

STT	Tiêu chí	Phương pháp	Tiêu chuẩn chấp nhận
1	Số lượng	Đếm và quan sát	Bộ mẫu chuẩn gồm 50 mẫu chuẩn âm tính và 50 mẫu chuẩn dương tính với anti-HBs
2	Cảm quan	Mắt thường	Màu vàng nhạt đến vàng, trong, không tan huyết, không vẩn đục, không có kết tủa
3	Xác định đặc tính anti-HBs	ELISA, test nhanh	100% mẫu âm tính với anti-HBs; 100% mẫu dương tính với anti-HBs

2.5.7. Đánh giá độ ổn định

❖ **Đánh giá độ ổn định trong điều kiện bảo quản thực**:

- Các bộ mẫu chuẩn sau khi đóng ống lưu giữ ở ≤-70°C để nghiên cứu độ ổn định trong 6 tháng. Tới thời điểm 6 tháng cần xác định lại đặc tính của từng mẫu thành viên, so sánh với đặc tính ban đầu tại thời điểm sản xuất.

- *Tiêu chuẩn chấp thuận:* Đặc tính của mỗi mẫu thành viên ở điều kiện ≤-70°C: thông qua cảm quan của mẫu không đổi màu, biến tính; không dương tính giả, âm tính giả qua phản ứng dương tính và âm tính của test thử nhanh, ELISA so với thời điểm sản xuất bộ mẫu.

❖ Đánh giá độ ổn định theo chu kỳ tan đông: Xác định đặc tính mẫu tại 5 chu kỳ tan đông được thực hiện bằng cách rã đông và đông lại. Trong đó: Số lượng mẫu cho mỗi chu kỳ: 7 mẫu (2 mẫu dương/1 dải nồng độ + 1 mẫu âm). Đánh giá đặc tính mẫu thông qua cảm quan của mẫu không đổi màu, biến tính; không dương tính giả, âm tính giả qua phản ứng dương tính và âm tính của test thử nhanh.

2.6. Xử lý và phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm Excel tính giá trị CV, giá trị trung bình OD trong phần xác định giá trị của thử nghiệm khi tính toán hiệu giá kháng thể.

2.7. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu tiến hành trên mẫu huyết thanh hồi cứu, không can thiệp đến điều trị bệnh nhân.

- Tất cả các mẫu thu thập và khẳng định đều được mã hóa để đảm bảo tính bảo mật và không có nguy cơ tiết lộ bất kỳ thông tin cá nhân nào liên quan đến đối tượng tình nguyện.

- Kết quả nghiên cứu sẽ chỉ phục vụ mục đích kiểm định tại NICVB, cam kết không sử dụng cho bất kỳ mục đích nào khác ngoài NICVB.

- Việc thu thập, sử dụng và lưu trữ các mẫu này đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học phê duyệt trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ.

2.8. Chỉ số nghiên cứu

Bảng 2. Chỉ số nghiên cứu

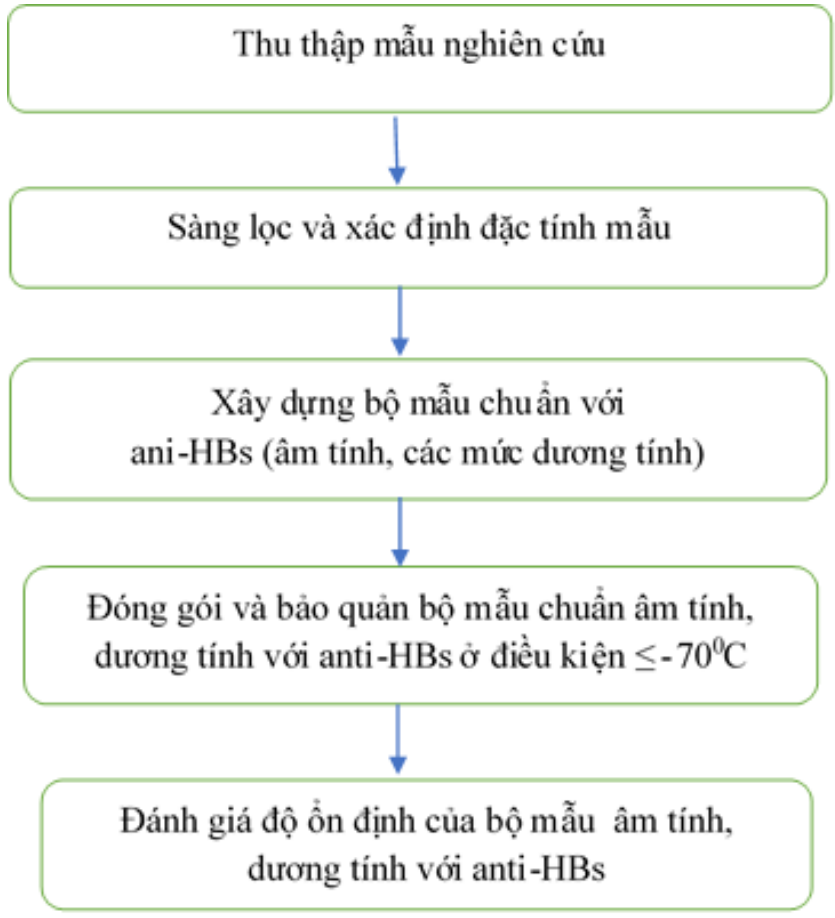
Chỉ tiêu	Mục đích	Phương pháp đo
Cảm quan	Đánh giá tính chất vật lý, màu sắc, độ trong và phát hiện các bất thường của huyết thanh mẫu (vẩn đục, tủa, tan huyết, nhiễm bẩn) độ trong của huyết thanh mẫu	Quan sát trực tiếp
Độ đặc hiệu	Đánh giá khả năng của bộ mẫu chuẩn phân biệt chính xác giữa mẫu có và không có kháng thể anti-HBs; không xảy ra phản ứng chéo hoặc dương tính giả khi kiểm định các thiết bị chẩn đoán nhanh Anti-HBs	Test nhanh, ELISA
Độ nhạy	Đánh giá khả năng phát hiện chính xác các mẫu có chưa chứa anti-HBs, đặc biệt các mẫu có nồng độ gần ngưỡng bảo vệ	Test nhanh, ELISA
Hiệu giá kháng thể	Xác định nồng độ (hiệu giá) kháng thể anti-HBs của từng mẫu để phân loại mức kháng thể và gán giá trị cho bộ mẫu chuẩn.	ELISA

3. Kết quả nghiên cứu

3.1 Xây dựng bộ mẫu chuẩn âm tính, dương tính với anti-HBs

3.1.1. Quy trình xây dựng bộ mẫu chuẩn âm tính, dương tính với anti-HBs

Quy trình xây dựng:



Sơ đồ 2. Quy trình xây dựng bộ mẫu chuẩn âm tính, dương tính với anti-HBs

3.1.2 Kết quả xây dựng bộ mẫu chuẩn âm tính với anti-HBs

Sử dụng kit test nhanh Genbody Anti-HBs-Hàn Quốc, ELISA (HBsAb Dia. Pro), trong số 150 mẫu huyết thanh được lấy từ nguồn mẫu dư thừa có 52 mẫu mẫu âm tính thật với anti-HBs được sàng lọc và khẳng định âm tính với anti-HBs bằng phương pháp test nhanh và miễn dịch gắn men (ELISA). Các mẫu âm tính với anti-HBs được sử dụng cho thiết lập bộ mẫu xác định độ đặc hiệu bao gồm: số lượng 01 bộ; mỗi bộ có 50 thành viên đã được khẳng định là âm tính với anti-HBs; hoàn thiện lý lịch mẫu cho từng thành viên (ID của bộ mẫu chuẩn được ký hiệu HBsAb-N01 đến HBsAb-N50)

Các mẫu còn lại sẽ được lưu, bảo quản theo quy định.

Kết quả xác định đặc tính anti-HBs của bộ mẫu chuẩn xác định độ đặc hiệu được trình bày bảng 3 như sau:

Bảng 3. Kết quả lựa chọn bộ mẫu chuẩn âm tính với anti-HBs

STT	Chỉ tiêu	Kết quả
1	Số lượng mẫu chuẩn	50
2	Khoảng nồng độ anti-HBs theo ELISA (mIU/mL)	<LoD – 8,94
3	Số mẫu có nồng độ < LoD	27
4	Số mẫu có nồng độ 0,01- 5 mIU/mL	19
5	Số mẫu có nồng độ 5,01- 9,99 mIU/mL	4
6	Kết quả test nhanh	50/50 âm tính
7	Tỷ lệ phù hợp giữa ELISA và test nhanh	100%

Dựa vào kết quả của bảng trên các mẫu được lựa chọn đáp ứng tiêu chí lựa chọn để đưa vào bộ mẫu chuẩn âm tính với anti-HBs.

3.1.3. Kết quả xây dựng bộ mẫu chuẩn dương tính với anti-HBs

Sử dụng kit test nhanh Genbody Anti-HBs-Hàn Quốc, ELISA (HBsAb Dia.Pro), trong số 150 mẫu huyết thanh được lấy từ nguồn mẫu dư thừa có 87 mẫu âm tính thật với anti-HBs được sàng lọc và khẳng định dương tính anti-HBs bằng phương pháp test nhanh và miễn dịch gắn men (ELISA). Các mẫu dương tính với anti-HBs được sử dụng cho thiết lập bộ mẫu xác định độ nhạy bao gồm: số lượng 01 bộ; mỗi bộ có 50 thành viên đã được khẳng định là dương tính với anti-HBs; hoàn thiện lý lịch mẫu cho từng thành viên (ID của bộ mẫu chuẩn được ký hiệu HBsAb-P01 đến HBsAb-P50), 37 mẫu còn lại sẽ lưu, bảo quản theo quy định.

Kết quả xác định đặc tính anti-HBs của bộ mẫu chuẩn xác định độ nhạy được trình bày bảng 4 như sau:

Bảng 4. Kết quả lựa chọn bộ mâu chuẩn dương với anti-HBs

STT	Chỉ tiêu	Kết quả
1	Số lượng chuẩn	50
2	Khoảng nồng độ anti-HBs theo ELISA (mIU/mL)	Từ 34,32 đến >250
3	Số mẫu có nồng độ thấp (30-100 mIU/mL)	24
4	Số mẫu có nồng độ trung bình (120- 250) mIU/mL	16
5	Số mẫu có nồng độ cao > 250 mIU/mL	10
6	Kết quả test nhanh	50/50 dương tính
7	Tỷ lệ phù hợp giữa ELISA và test nhanh	100%

Dựa vào kết quả của bảng 4 cho thấy các mẫu được lựa chọn đáp ứng tiêu chí lựa chọn để đưa vào bộ mẫu chuẩn dương tính với anti-HBs.

3.2 Đánh giá độ ổn định bộ mẫu chuẩn

3.2.1. Kết quả đánh giá độ ổn định của các bộ mẫu chuẩn âm tính với anti-HBs theo thời gian thực (≤-70^{0}C)

Bảng 5. Kết quả đánh độ ổn định của bộ mẫu chuẩn âm tính với anti-HBs bằng phương pháp test nhanh

Thời gian bảo quản	Số mẫu đánh giá (n)	Kết quả âm tính (n/tổng số)	Tỷ lệ ổn định (%)
0 tháng	50	50/50	100
06 tháng	50	50/50	100

Bảng 6. Kết quả đánh độ ổn định của bộ mẫu chuẩn âm tính với anti-HBs bằng phương pháp ELISA

Mã mẫu	Nồng độ ban đầu (mIU/mL)	Nồng độ sau 6 tháng (mIU/mL)	Kết quả
HBsAb-N03	< Min	< Min	Ổn định
HBsAb-N04	< Min	< Min	Ổn định
HBsAb-N09	0,1561	< Min	Ổn định

Sau 6 tháng bảo quản ở ≤-70^{0}C, cả ba mẫu đại diện vẫn có nồng độ anti-HBs dưới giới hạn định lượng của bộ kit ELISA. Đồng thời, tất cả các mẫu vẫn cho kết quả âm tính trên thiết bị chẩn đoán nhanh. Kết quả cho thấy bộ mẫu chuẩn âm tính với anti-HBs duy trì được tính ổn định trong thời gian bảo quản của nghiên cứu.

3.2.2. Kết quả đánh giá độ ổn định của các bộ mẫu chuẩn âm tính với anti-HBs theo thời gian thực (≤-70^{0}C)

Bảng 7. Kết quả đánh độ ổn định của bộ mẫu chuẩn dương tính với anti-HBs bằng phương pháp test nhanh

Thời gian bảo quản	Số mẫu đánh giá (n)	Kết quả dương tính (n/tổng số)	Tỷ lệ ổn định (%)
0 tháng	50	50/50	100
06 tháng	50	50/50	100

Bảng 8. Kết quả đánh độ ổn định của bộ mẫu chuẩn dương tính với anti-HBs bằng phương pháp ELISA

Mã mẫu	Mức nồng độ	Nồng độ ban đầu (mIU/mL)	Nồng độ sau 6 tháng (mIU/mL)	Kết quả
HBsAb-P01	Cao	>250	>250	Ổn định
HBsAb-P02	Cao	>250	>250	Ổn định
HBsAb-P04	Cao	>250	>250	Ổn định
HBsAb-P27	Trung bình	216,3	191,5	Ổn định
HBsAb-P28	Trung bình	208,8	168,5	Ổn định
HBsAb-P31	Trung bình	173,4	221,5	Ổn định
HBsAb-P42	Thấp	101,6	99,03	Ổn định

Sau 6 tháng bảo quản ở -70 ± 10°C, cả ba mẫu có nồng độ anti-HBs >250 mIU/mL vẫn duy trì kết quả >250 mIU/mL theo ELISA. Bốn mẫu còn lại có sự thay đổi nhẹ về nồng độ anti-HBs, tuy nhiên vẫn duy trì trong cùng khoảng nồng độ ban đầu (mức thấp hoặc mức trung bình). Đồng thời, tất cả các mẫu vẫn cho kết quả dương tính trên thiết bị chẩn đoán nhanh. Kết quả cho thấy các mẫu đại diện của bộ mẫu chuẩn dương tính không có sự thay đổi đáng kể về đặc tính sau 6 tháng bảo quản ở ≤-70^{0}C.

3.2.3. Kết quả đánh giá độ ổn định của các bộ mẫu chuẩn âm tính, dương tính với anti-HBs theo chu kỳ tan đông

Bảng 9. Kết quả đánh độ ổn định của bộ mẫu chuẩn âm tính, dương tính với anti-HBs qua chu kỳ tan đông

STT	ID Mẫu	Mức nồng độ	Nồng độ anti-HBs tại T0 (mIU/mL)	Chu kỳ 1	Chu kỳ 2	Chu kỳ 3	Chu kỳ 4	Chu kỳ 5	Kết luận
1	HBsAb-P05	Cao	>250	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Ổn định
2	HBsAb-P06	Cao	>250	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Ổn định
3	HBsAb-P34	Thấp	162,80	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Ổn định
4	HBsAb-P35	Thấp	145,70	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Ổn định
5	HBsAb-P43	Trung bình	66,06	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Ổn định
6	HBsAb-P44	Trung bình	58,50	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Ổn định
7	HBsAb-N01	Âm tính	1,92	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Ổn định

Kết quả đánh giá cho thấy sau 5 chu kỳ tan đông, 6 mẫu dương tính và 1 mẫu âm tính đều duy trì kết quả xét nghiệm như ban đầu trên thiết bị chẩn đoán nhanh phát hiện anti-HBs. Không ghi nhận sự thay đổi về kết quả định tính giữa các chu kỳ tan đông, chứng tỏ bộ mẫu chuẩn có độ ổn định tốt qua các chu kỳ tan đông.

4. Bàn luận

4.1. Quy trình xây dựng bộ mẫu chuẩn âm tính, dương tính với anti-HBs

Quy trình xây dựng bộ mẫu chuẩn anti-HBs trong nghiên cứu này được thiết kế trên cơ sở các nguyên tắc về lựa chọn, đặc trưng hóa mẫu lâm sàng, đánh giá hiệu năng và quản lý vật liệu đánh giá được đề cập trong các hướng dẫn của WHO, Cơ quan Quản lý Dược phẩm châu Âu (EMA) và Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [3-4]. Quy trình bao gồm các bước thu

thập, sàng lọc, xác định đặc tính mẫu, xây dựng bộ mẫu chuẩn, đóng gói, bảo quản và đánh giá độ ổn định. Việc lựa chọn các mẫu có đặc tính huyết thanh học được xác định rõ ràng giúp bảo đảm tính đại diện và phù hợp cho mục đích đánh giá chất lượng thiết bị chẩn đoán nhanh phát hiện kháng thể anti-HBs. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ ≤ −70°C và đánh giá độ ổn định thông qua điều kiện bảo quản thực và các chu kỳ tan đông nhằm xác nhận khả năng duy trì đặc tính của mẫu trong quá trình lưu trữ và sử dụng. Quy trình được xây dựng có tính khả thi, phù hợp với điều kiện của các cơ sở kiểm định và có thể làm cơ sở cho việc xây dựng, chuẩn hóa bộ mẫu chuẩn anti-HBs phục vụ đánh giá hiệu năng và kiểm soát chất lượng các thiết bị chẩn đoán in vitro

4.2. Bàn luận bộ mẫu chuẩn âm tính, dương tính với anti-HBs

Theo các hướng dẫn của WHO và U.S. Food and Drug Administration (FDA), việc đánh giá hiệu năng các thiết bị chẩn đoán in vitro (IVD), bao gồm thiết bị phát hiện kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt vi rút viêm gan B (anti-HBs), cần được thực hiện trên các bộ mẫu lâm sàng đại diện cho quần thể mục tiêu và phù hợp với mục đích sử dụng của thiết bị [5–6]. Do sự khác biệt về đặc điểm dịch tễ học, đáp ứng miễn dịch và quần thể dân cư giữa các quốc gia, việc xây dựng bộ mẫu chuẩn lâm sàng đặc trưng cho từng quốc gia có ý nghĩa quan trọng trong đánh giá hiệu năng, thẩm định và kiểm soát chất lượng các thiết bị chẩn đoán lưu hành. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu thập 150 mẫu huyết thanh từ người Việt Nam thuộc nhiều nhóm tuổi, bao gồm cả nam và nữ. Các mẫu được sàng lọc và đặc trưng bằng phương pháp tham chiếu ELISA, sau đó phân loại thành các nhóm có nồng độ kháng thể anti-HBs cao, trung bình, thấp và âm tính. Bộ mẫu được xây dựng bao phủ toàn bộ dải nồng độ kháng thể từ mức thấp, gần giới hạn phát hiện của xét nghiệm, đến mức trung bình và cao, đồng thời bao gồm các mẫu âm tính nhằm phục vụ đánh giá cả độ nhạy và độ đặc hiệu của thiết bị. Việc lựa chọn các mẫu đại diện cho các mức đáp ứng miễn dịch khác nhau, đồng thời bao gồm các trường hợp có khả năng gây nhiễu hoặc mắc các bệnh lý liên quan, góp phần bảo đảm bộ mẫu phản ánh đầy đủ các tình huống lâm sàng thường gặp và đáp ứng yêu cầu đánh giá hiệu năng của các thiết bị chẩn đoán in vitro theo các hướng dẫn hiện hành [4,7,8]. LOD (Limit of Detection) là nồng độ thấp nhất mà test có thể phát hiện với độ tin cậy chấp nhận được (thường xác định ở mức 95% probability). Dựa trên hướng dẫn về test nhanh kháng nguyên viêm gan B [9], mức thấp khoảng 2–3 x LOD để kiểm tra độ nhạy tại giới hạn phát hiện, mức trung bình khoảng 5–7 x LOD đánh giá mức độ ổn định và nhất quán của test, còn lại sẽ đưa vào mức cao để đánh giá khả năng phát hiện tốt. Vì giới hạn phát hiện của phần lớn các test nhanh chẩn đoán kháng thể viêm gan B nằm trong khoảng 10-30 mIU/ml, do đó chúng tôi đã lựa chọn và phân cấp nồng độ cho bộ mẫu chuẩn: mức cao (>250 mIU/mL), trung bình (120–250mIU/mL) và thấp (30–100 mIU/mL)**.**

Kháng thể viêm gan B được xác định để đánh giá miễn dịch bảo vệ sau tiêm chủng hoặc sau khi hồi phục khỏi nhiễm

HBV. Theo WHO và CDC, nồng độ kháng thể viêm gan B ≥10 mIU/mL được xem là có hiệu lực bảo vệ. Tuy nhiên, trong thực tế, hiệu giá kháng thể rất đa dạng giữa các cá thể; việc chọn các mốc phân dải như trên là hợp lý >250 mIU/mL (mức cao) đại diện cho cá thể có đáp ứng mạnh sau tiêm chủng hoặc tái nhiễm. Nồng độ kháng thể trong khoảng 120–250 mIU/mL (mức trung bình) đại diện cho nhóm đáp ứng miễn dịch thông thường, phản ánh khả năng phát hiện ở nồng độ lâm sàng điển hình. Nồng độ kháng thể trong khoảng 30–100 mIU/mL (mức thấp) đại diện cho các trường hợp có miễn dịch giới hạn hoặc suy giảm miễn dịch, giúp đánh giá độ nhạy ở ngưỡng giới hạn, nồng độ biên (borderline) của test. Ngoài ra, các mẫu âm tính (anti-HBV <10 mIU/mL) để đảm bảo đánh giá độ đặc hiệu và loại trừ kết quả giả dương.

Dựa trên kết quả xác định đặc tính và xác định nồng độ anti-HBs trong quá trình xây dựng mẫu chuẩn, với mỗi loại mẫu chuẩn, chúng tôi thiết lập 01 bộ. Số thành viên là 50 mẫu cho độ nhạy, 50 mẫu cho độ đặc hiệu. Thể tích mỗi mẫu là 0,5 ml/ mẫu có thể sử dụng cho nhiều lần kiểm định để đảm bảo chất lượng mẫu không bị ảnh hưởng sau 5 lần tan đông. Tất cả các mẫu được mã hóa và quản lý mã số và sơ đồ, đồng thời có thể truy xuất mọi thông tin về mẫu thông qua lý lịch mẫu.

4.3. Bàn luận độ ổn định bộ mẫu chuẩn âm tính, dương tính với anti-HBs

Độ ổn định là một trong những tiêu chí quan trọng quyết định giá trị sử dụng của bộ mẫu chuẩn trong kiểm định chất lượng thiết bị chẩn đoán in vitro. Trong nghiên cứu này, độ ổn định của bộ mẫu chuẩn anti-HBs được đánh giá bằng nghiên cứu thời gian thực khi bảo quản ở nhiệt độ ≤ -70°C và thông qua khả năng chịu 5 chu kỳ tan đông.

Kết quả cho thấy bộ mẫu chuẩn duy trì tính ổn định sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ ≤ -70°C. Các mẫu có nồng độ anti-HBs cao vẫn giữ nguyên kết quả định lượng, trong khi các mẫu có nồng độ trung bình chỉ ghi nhận dao động nhỏ về nồng độ nhưng không làm thay đổi mức phân loại hoặc kết quả xét nghiệm. Điều này cho thấy điều kiện bảo quản ≤ -70°C phù hợp để duy trì tính ổn định của bộ mẫu chuẩn trong thời gian nghiên cứu.

Bên cạnh đó, sau 5 chu kỳ tan đông, cả 6 mẫu dương tính và 1 mẫu âm tính đều giữ nguyên kết quả khi đánh giá bằng thiết bị chẩn đoán nhanh anti-HBs. Không ghi nhận sự thay đổi kết quả xét nghiệm sau các chu kỳ tan đông, chứng tỏ bộ mẫu chuẩn có khả năng chịu được quá trình rã đông và sử dụng lặp lại mà không ảnh hưởng đến đặc tính của mẫu. Đây là yếu tố quan trọng đối với bộ mẫu chuẩn sử dụng trong kiểm định chất lượng, góp phần đảm bảo tính ổn định của mẫu trong quá trình bảo quản, vận chuyển và sử dụng tại phòng thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu phù hợp với các khuyến cáo về bảo quản mẫu huyết thanh dùng làm vật liệu chuẩn, trong đó nhiệt độ ≤ -70°C được sử dụng để duy trì tính ổn định của các thành phần sinh học trong thời gian dài. Tuy nhiên, hạn chế của nghiên cứu mới đánh giá độ ổn định trong thời gian 6 tháng và sau 5 chu kỳ tan đông. Do đó, cần tiếp tục theo dõi ở các mốc thời gian dài hơn nhằm cung cấp thêm cơ sở khoa học cho việc xác

định hạn sử dụng của bộ mẫu chuẩn.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng thành công bộ mẫu chuẩn gồm 50 mẫu âm tính và 50 mẫu dương tính với anti-HBs, trong đó các mẫu dương tính được phân thành ba mức: dương tính thấp, dương tính trung bình và dương tính cao. Bộ mẫu chuẩn duy trì tính ổn định sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ ≤-70°C và sau 5 chu kỳ tan đông. Kết quả nghiên cứu cho thấy bộ mẫu chuẩn đáp ứng yêu cầu về thành phần, cơ cấu và độ ổn định, phù hợp để sử dụng trong kiểm định và đánh giá chất lượng thiết bị chẩn đoán nhanh phát hiện kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt vi rút viêm gan B (anti-HBs).

Tài liệu tham khảo

[1] World Health Organization. Hepatitis B fact sheet. [cited 2026 Aug 28]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b.

[2] Bùi Đại. Viêm gan vi rút B và D. Trong: *Bệnh học Nội khoa – Tập 6: Bệnh gan mật*. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học; 2002.

[3] World Health Organization. *Technical Specifications Series (TSS)-6: Panels for quality assurance and quality control of in vitro diagnostic medical devices*. Geneva: World Health Organization; 2017.

[4] European Medicines Agency. *Guideline on Performance Evaluation of In Vitro Diagnostic Medical Devices*. Amsterdam: EMA; 2021.

[5] World Health Organization. *WHO Technical Report Series No. 1003: Global Model Regulatory Framework for Medical Devices including In Vitro Diagnostic Medical Devices*. Geneva: World Health Organization; 2017.

[6] U.S. Food and Drug Administration. *Serology Template – Emergency Use Authorization for In Vitro Diagnostic Devices Detecting or Correlating to Neutralizing Antibodies*. Washington, DC: FDA; 2021.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. *EP17-A2: Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline – Second Edition*. Wayne, PA: CLSI; 2012.

[8] Clinical and Laboratory Standards Institute. *EP12-A2: User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline – Second Edition* (Correction notice issued October 8, 2021). Wayne, PA: CLSI; 2019.

[9] World Health Organization. *TSS-13: Rapid diagnostic tests to detect hepatitis B surface antigen. Technical Specifications Series for submission to WHO Prequalification – Diagnostic Assessment*. Geneva: World Health Organization; 2022.