

15.46 CÁC KỸ THUẬT ELISA (PHƯƠNG PHÁP MIỀN DỊCH GẮN MEN, PHƯƠNG PHÁP ELISA)

Nguyên tắc

Nguyên tắc chung: Các kỹ thuật ELISA đôi khi còn được gọi là EIA rất đa dạng và đặc điểm chung là dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, trong đó kháng thể được gắn với một enzym. Khi cho thêm cơ chất thích hợp (thường là nitrophenol phosphat, TMB, ABTS) enzym sẽ thủy phân cơ chất thành một chất có màu. Sự xuất hiện màu hoặc tín hiệu của chất phát quang chứng tỏ đã xảy ra phản ứng đặc hiệu giữa kháng thể với kháng nguyên và thông qua đậm độ màu và cường độ sáng phát ra mà biết được nồng độ kháng nguyên hay kháng thể cần phát hiện.

Các kỹ thuật ELISA có độ nhạy khá cao và đơn giản, cho phép ta xác định kháng nguyên hoặc kháng thể ở một nồng độ rất thấp (khoảng 0,1 ng/ml). So với kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (RIA) thì kỹ thuật này rẻ tiền và an toàn hơn mà vẫn đảm bảo độ chính xác như nhau. ELISA được dùng để phát hiện và định lượng nhiều tác nhân gây bệnh như virus, vi khuẩn, nấm, kí sinh và các chất có bản chất là peptid, protein, kháng thể, hormon,... và được sử dụng rất nhiều trong kiểm tra công hiệu, nhận dạng vắc xin và sinh phẩm; định lượng hàm lượng các chất tồn dư trong vắc xin có bản chất là protein như: BSA, ovalbumin, gentamicin, neomycin...

Kỹ thuật ELISA gồm ba thành phần tham gia phản ứng là kháng nguyên, kháng thể và chất tạo màu, phản ứng cần có hoạt tính xúc tác của enzym; thực hiện qua hai bước:

Phản ứng miễn dịch học: Là sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể.

Phản ứng hóa học: Thông qua hoạt tính xúc tác của enzym làm giải phóng oxy nguyên tử (oxygen) từ H₂O₂ để oxy hóa cơ chất chỉ thị màu, do đó làm thay đổi màu của hỗn hợp trong dung dịch thử nghiệm.

Nguyên tắc thực hiện thử nghiệm:

Sử dụng kit ELISA chuyên dụng: Phải tuân thủ đầy đủ các bước cơ bản của quy trình theo hướng dẫn sử dụng, đánh giá thử nghiệm của từng bộ kit:

Quy trình ELISA tự gắn kit: Theo Quy trình thao tác chuẩn. Các bước cơ bản bao gồm: Pha hóa chất (kháng thể hoặc kháng nguyên) để gắn phiến; Nhỏ lên phiến chuyên dụng; Ủ phiến; Xử lý phiến sau gắn rồi cũng pha mẫu và làm các bước tương tự như quy trình của kit thương mại. Tuy nhiên kit tự gắn thì bước rửa nên rửa bằng tay để hạn chế sự bong tróc các kháng nguyên/kháng thể đã gắn trên giếng.

Tính kết quả: Theo phần mềm chuyên dụng được công nhận.

Các kỹ thuật ELISA

ELISA trực tiếp

Đây là dạng đơn giản nhất trong các kỹ thuật ELISA. Trong đó, kháng nguyên cần phát hiện sẽ được gắn trực tiếp lên bề mặt phiến và sẽ được phát hiện bằng một kháng thể duy nhất (kháng thể này đã được gắn enzym). Các bước thực hiện được mô tả khái quát trong Sơ đồ 15.46.1. Chi tiết xem QUY TRÌNH I.

Gắn kháng nguyên vào phiến ELISA



Sơ đồ 15.46.1 - Các bước thực hiện phản ứng ELISA trực tiếp

Ưu điểm: Đơn giản (chỉ cần kháng thể gắn enzym, cơ chất và dung dịch dừng phản ứng); Nhanh (chỉ vài bước đã có kết quả); Hạn chế xảy ra phản ứng chéo vì chỉ sử dụng một loại kháng thể duy nhất.

Nhược điểm:

Độ đặc hiệu bị giới hạn vì thông thường kháng nguyên có ít nhất là 2 epitope (vị trí trình diện kháng nguyên) mà phương pháp này chỉ sử dụng một kháng thể gắn vào một epitope. Phản ứng miễn dịch của kháng thể sơ cấp bị hạn chế bởi có gắn với enzym đánh dấu hoặc các đuôi.

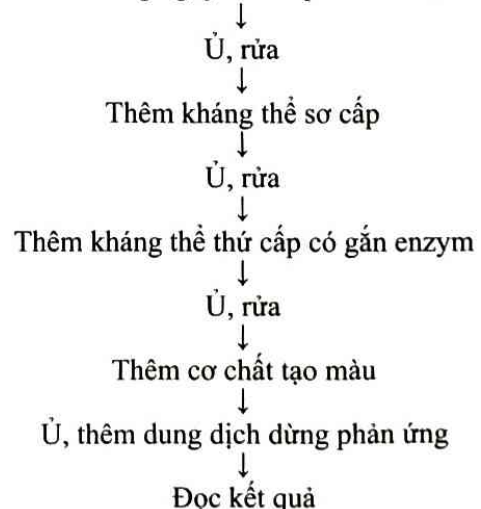
Phải đánh dấu cho từng kháng thể chuyên biệt với từng đối tượng nên mất thời gian và tốn kém... Không phù hợp cho các vắc xin đa týp.

Từ những ưu và nhược điểm trên nên phương pháp này thường được dùng để phát hiện nhanh kháng nguyên trong mẫu xét nghiệm và rất ít được lựa chọn trong việc định lượng.

ELISA gián tiếp

Trong kỹ thuật này kháng thể kết hợp kháng nguyên không được gắn enzym mà nó là mục tiêu gắn đặc hiệu của một kháng thể khác (kháng thể này mới là kháng thể được gắn với enzym). Các bước thực hiện được mô tả khái quát trong Sơ đồ 15.46.2. Chi tiết xem QUY TRÌNH II.

Gắn kháng nguyên vào phiến ELISA



Sơ đồ 15.46.2 - Các bước thực hiện phản ứng ELISA gián tiếp

Ưu điểm:

Kháng thể gắn enzym có thể sử dụng để đánh dấu cho nhiều loại kháng nguyên (nhất là các vắc xin đa týp) nên tiện lợi và kinh tế hơn, dễ dàng thương mại hóa.

Phản ứng miễn dịch của kháng thể sơ cấp không bị hạn chế bởi nó không gắn với enzym đánh dấu hoặc các đuôi. Độ nhạy/độ đặc hiệu được tăng lên vì mỗi kháng thể sơ cấp có chứa một số epitope có thể gắn với kháng thể thứ cấp được đánh dấu enzym.

Nhược điểm:

Độ đặc hiệu của từng kháng thể là khác nhau. Điều này dẫn đến kết quả khác nhau giữa các thử nghiệm và do đó cần phải thử nghiệm với nhiều kháng thể khác nhau để kết quả có thể tin tưởng được.

Phản ứng chéo có thể diễn ra với kháng thể thứ cấp tạo phản ứng không đặc hiệu (dương tính giả cao).

Quy trình kéo dài thêm 1 bước ù.

Từ những ưu - nhược điểm trên nên phương pháp này thường được dùng để phát hiện (nhanh) kháng nguyên trong mẫu xét nghiệm và rất ít được lựa chọn trong việc định lượng. Nếu định lượng nên sử dụng ELISA sandwich.

ELISA Sandwich

Đây là một dạng ELISA được sử dụng phổ biến nhất trong thực tiễn do nó cho phản ứng mạnh và nhạy. Được gọi là “sandwich” là do kết quả thử nghiệm được đánh giá thông qua sự kết hợp của hai loại kháng thể là kháng thể bắt giữ (capture antibodies) và kháng thể phát hiện (detection antibodies). Kỹ thuật này cũng được phân làm hai dạng là ELISA sandwich trực tiếp (DAS-ELISA) và ELISA sandwich gián tiếp (TAS-ELISA).

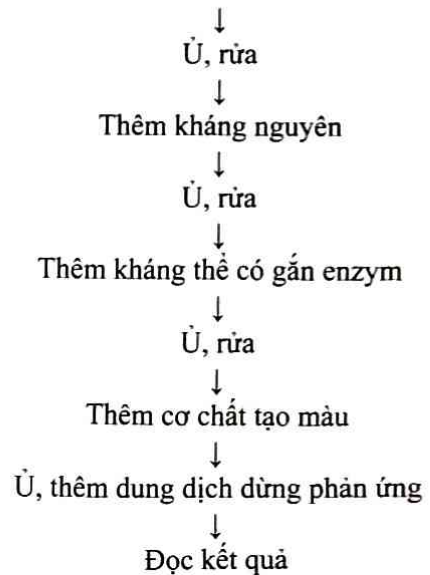
1) ELISA Sandwich trực tiếp (DAS-ELISA)

DAS ELISA gồm sự dính thụ động của kháng thể vào pha rắn (đáy giếng). Sau ù, rửa, các giếng được bổ sung dung dịch bão hòa phiến (blocking buffer hay saturation) thích hợp để phủ kín các vị trí còn trống trên giếng sau khi gắn kháng thể. Dung dịch bão hòa phiến thường là PBS 10 mM - 1 % BSA - 0,05 % tween 20; hoặc PBS 10 mM - 1 % Casein - 0,05 % tween 20; hoặc PBS 10 mM - 0,025 % Tween 20 - 2 % skim milk; hoặc PBS 10 mM - 0,05 % Tween 20 - 2 % gelatin cá. Những thành phần của dung dịch bão hòa phiến không được chứa bất kỳ kháng nguyên nào có thể kết hợp với kháng thể bắt giữ. Sau đó, cho mẫu thử chứa kháng nguyên vào và để phản ứng kháng nguyên-kháng thể xảy ra. Những kháng nguyên được pha loãng trong dung dịch bão hòa phiến nhằm ngăn sự dính không chuyên biệt của chúng vào pha rắn. Sau khi ù và rửa, chỉ còn phức hợp kháng nguyên - kháng thể dính vào pha rắn. Kháng thể bắt giữ có gắn enzym sau đó được thêm vào sẽ kết hợp trực tiếp với kháng nguyên đích. Kháng thể thứ hai này có thể giống kháng thể thứ nhất (kháng thể phát hiện) hoặc khác về nguồn động vật hay loài động vật sản xuất kháng thể. Sau khi ù, rửa, thêm cơ chất vào và đọc kết quả trên máy đo quang phổ.

Chú ý: Nếu sử dụng kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện giống nhau có thể dẫn đến vấn đề nếu có sự giới hạn vị trí kết hợp sẵn có để phát hiện. Mọi quan hệ về kích thước và vị trí không gian của các epitope cũng có ảnh hưởng đến thử nghiệm. Chi tiết xem QUY TRÌNH III A và III B.

Các bước thực hiện được mô tả khái quát trong Sơ đồ 15.46.3.

Gắn kháng thể thứ I vào phiến ELISA



Sơ đồ 15.46.3 - Các bước thực hiện ELISA Sandwich trực tiếp

Trong sơ đồ 15.46.3, có thể thay kháng thể bằng kháng nguyên, lúc đó sẽ sử dụng kháng thể gắn enzym. Biotin được sử dụng như một kháng thể chống lại kháng nguyên đích. Lúc đó để phát hiện Biotin thường dùng streptavidin hoặc avidin gắn enzym tạo phức hợp: Kháng thể-Biotinylate-Streptavidin-Enzym. Phương pháp này được áp dụng trong sản xuất các kit chẩn đoán HIV, HCV... Một số loại kit thương phẩm để rút ngắn thời gian, sau bước nhỏ kháng nguyên sẽ nhỏ luôn kháng thể có gắn enzym vào rồi ù. Như vậy sẽ giảm bớt được một bước ù. Phương pháp này được ứng dụng trong sản xuất các kit thương phẩm để định lượng BSA, Ovalbumin tồn dư trong vắc xin hay trong thử nghiệm kiểm tra hàm lượng HBsAg trong các vắc xin viêm gan B (thử nghiệm kiểm tra công hiệu, nhận dạng *in vitro*).

Ưu điểm: Có thể phát hiện sự khác biệt nhỏ giữa các kháng nguyên nếu sử dụng kháng thể bắt và kháng thể phát hiện khác nhau.

Nhược điểm : Vì sử dụng một kháng thể gắn kết với enzym nên hệ thống bị giới hạn về tính chuyên biệt và những thành phần gắn liền với kháng thể chuyên biệt. Điều này giới hạn sự linh hoạt của phương pháp, ví dụ như mỗi kháng thể được sử dụng phải được đánh dấu riêng (cho những kháng nguyên khác nhau). Theo cách này, DAS-ELISA bị giới hạn về sự chuẩn bị kháng thể. Hệ thống cũng bị giới hạn ở chỗ kháng nguyên phải có ít nhất hai epitope vì cả hai kháng thể bắt giữ và phát hiện đều kết hợp trực tiếp với kháng nguyên.

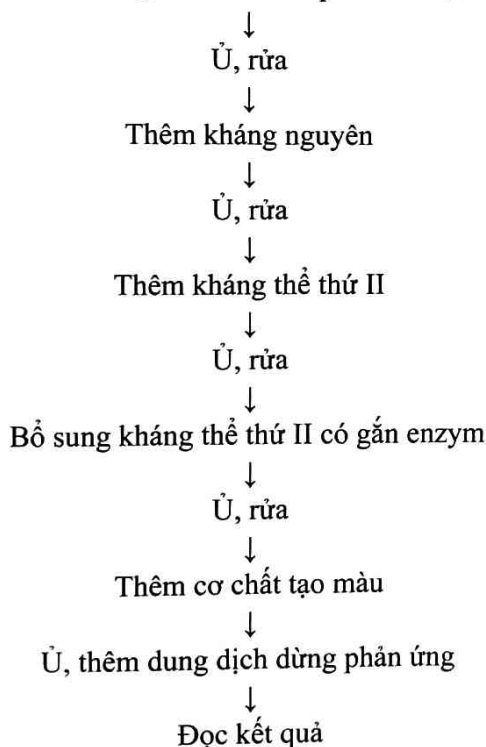
Kháng thể bắt giữ trên pha rắn và kháng thể phát hiện có thể chống lại những epitope khác nhau trên phức hợp kháng nguyên. Do đó, thuận lợi khi khảo sát sự khác biệt nhỏ giữa những kháng nguyên nếu sử dụng kháng thể phát hiện và kháng thể bắt giữ khác nhau.

2) *ELISA Sandwich gián tiếp*: Ứng dụng trong thử nghiệm kiểm tra vắc xin đa týp như vắc xin phòng papillomavirus (Gardasil, Cervarix), IPV (bại liệt bất hoạt). Các bước thực hiện được mô tả khái quát trong Sơ đồ 15.46.4.

Biotin được sử dụng như một kháng thể thứ II. Kháng thể thứ hai này có vai trò bắt giữ không cho kháng thể thứ II có gắn enzym bị rửa trôi. Để phát hiện các protein được biotinylated người ta thường sử dụng streptavidin hoặc avidin là hai loại protein có phản ứng tạo ái lực cao với các phân tử protein được biotinylated hóa. Enzym HRP thường được gắn cộng hợp với streptavidin hoặc avidin. Việc sử dụng biotin như một kháng thể thứ II chung cho các vắc xin/chủng virus, vi khuẩn đa týp có nhiều lợi ích là giảm kinh phí và thời gian cho việc tạo liên kết giữa enzym với từng kháng thể II chuyên biệt. Ngoài ra phương pháp này chuyên biệt hơn ELISA sandwich trực tiếp do kháng thể được gắn enzym không phản ứng với kháng thể bắt kháng nguyên.

Phương pháp này có ưu điểm hơn hẳn những phương pháp khác nên thường được chọn để định tính các týp trong các vắc xin đa giá hoặc bệnh virus, vi khuẩn đang nghiên cứu (chưa rõ týp nào).

Gắn kháng thể thứ I vào phiến ELISA



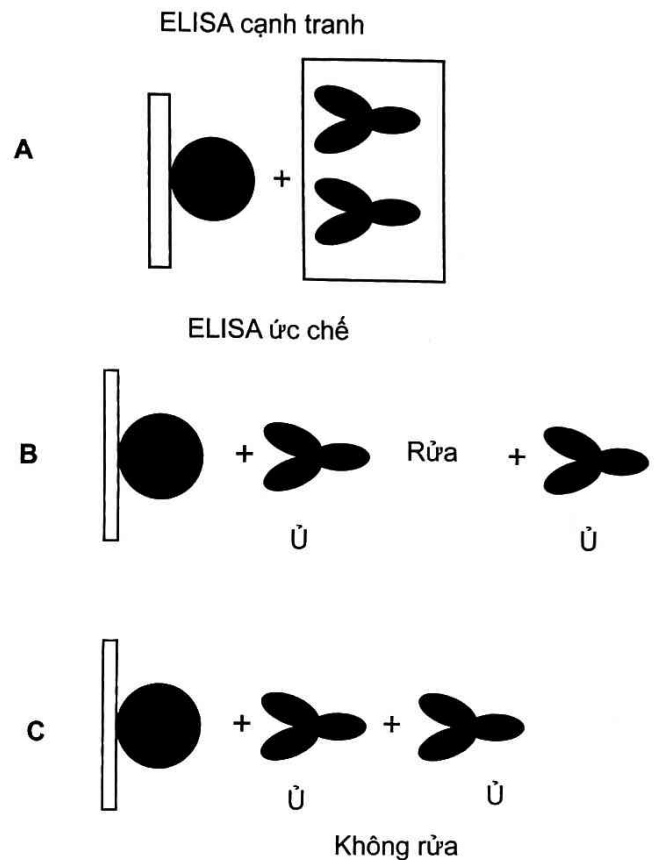
Sơ đồ 15.46.4 - Các bước thực hiện ELISA Sandwich gián tiếp

ELISA ức chế hoặc cạnh tranh

ELISA cạnh tranh (competition ELISA) là thử nghiệm ELISA, trong đó hai chất tham gia phản ứng cùng ái lực

bắt cặp với chất thứ ba. Trong phép thử ELISA cạnh tranh (phản ứng cạnh tranh) thì hai chất cạnh tranh phải được đưa vào đồng thời.

Sự khác biệt giữa ức chế và cạnh tranh: Cả hai phản ứng đều có sự tham gia của hai kháng thể phản ứng với kháng nguyên. Nếu một kháng thể được ủ trước phản ứng đó được gọi là ức chế (blocking/ inhibition assays). Phản ứng cạnh tranh mang nghĩa cả hai kháng thể được thêm vào đồng thời với nhau (Hình 15.46.1).



Hình 15.46.1 - Sự khác biệt giữa ức chế và cạnh tranh

1) *ELISA cạnh tranh trực tiếp (Direct C-Elisa) kiểm tra kháng nguyên*

Trong hệ thống trực tiếp, lượng kháng nguyên trên bề mặt phiến và lượng kháng thể gắn enzym đã được chuẩn độ để tối ưu. Kháng nguyên và kháng thể gắn enzym được thêm vào phiến cùng một lúc để tạo ưu thế cạnh tranh.

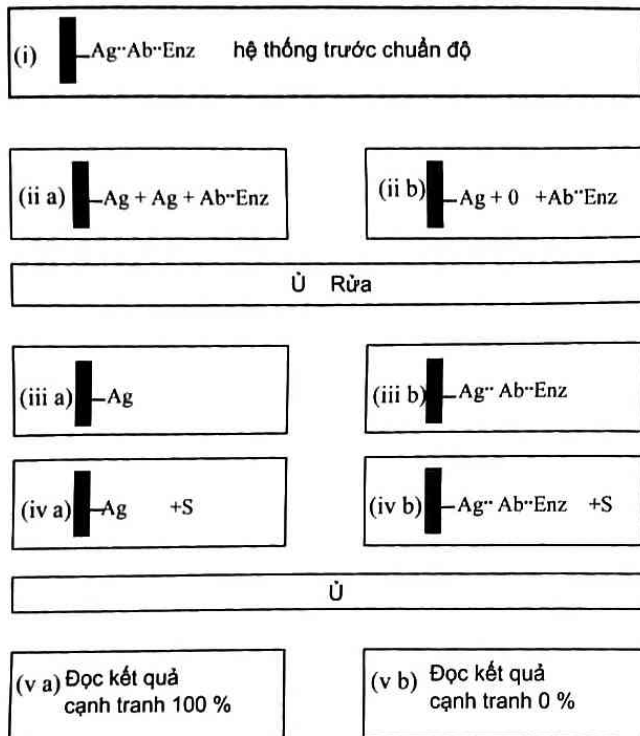
Nếu kháng nguyên tương tự hoặc cùng loại như kháng nguyên đã được gắn trên phiến thì kháng thể gắn enzym sẽ gắn lên kháng nguyên này. Khi nồng độ của kháng nguyên cạnh tranh cao sẽ ngăn cản bất kỳ sự kết hợp của kháng thể gắn enzym với kháng nguyên trên bề mặt phiến (cạnh tranh 100 %). Nếu nồng độ kháng nguyên cạnh tranh giảm (ví dụ do pha loãng) sự cạnh tranh sẽ giảm. Như vậy nồng độ kháng nguyên cạnh tranh càng cao thì độ hấp thu màu càng giảm.

Kháng nguyên cạnh tranh có thể được thêm trực tiếp vào

đĩa nếu nó được pha loãng trong dung dịch bão hòa phiến trước khi thêm kháng thể gắn enzym.

Mức độ cạnh tranh theo thời gian phụ thuộc vào mối tương quan của nồng độ phân tử cần kiểm tra và kháng nguyên trên bề mặt phiến (và mức độ tương đồng của kháng nguyên). Sau khi ủ và rửa, lượng kháng thể có đánh dấu được định lượng sau khi thêm cơ chất. Khi không có kháng nguyên trong mẫu kiểm tra hay không có sự tương đồng của kháng nguyên thì không có sự gắn kết với kháng thể được đánh dấu và không có sự cạnh tranh với kháng nguyên này. Kết quả là mẫu có chứa kháng nguyên thì sự cạnh tranh làm giảm cường độ màu còn đối chứng âm thì không.

ELISA cạnh tranh trực tiếp kiểm tra kháng nguyên được mô tả ở Sơ đồ 15.46.5.



Ag: kháng nguyên; Ab: kháng thể; **Enz: Enzym gắn cộng hợp; S: cơ chất

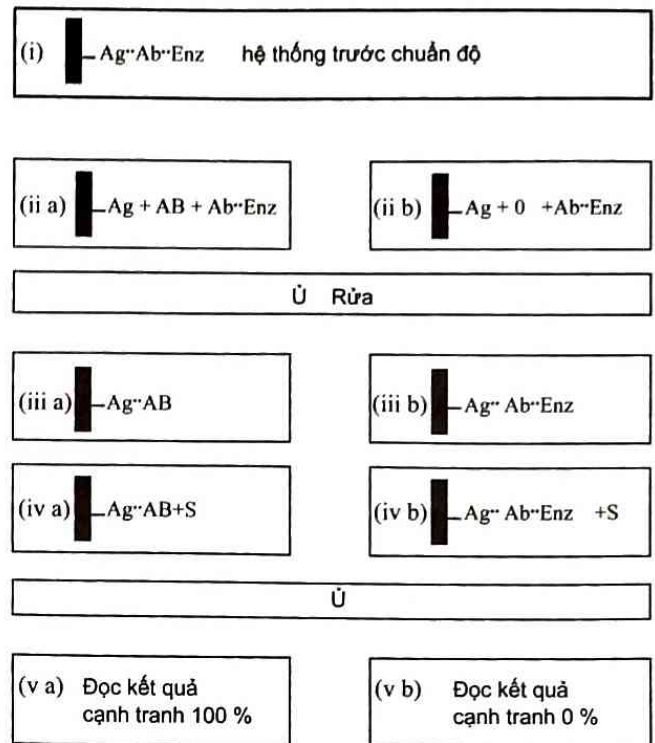
Sơ đồ 15.46.5 - ELISA cạnh tranh trực tiếp kiểm tra kháng nguyên

2) ELISA cạnh tranh trực tiếp (Direct C-Elisa) kiểm tra kháng thể

Direct C-ELISA kiểm tra kháng thể tương tự với Direct C-ELISA kiểm tra kháng nguyên. Sự cạnh tranh ở đây là giữa kháng thể trong mẫu và kháng thể được đánh dấu với các vị trí trên kháng nguyên gắn sẵn trên phiến. Mẫu và kháng thể đánh dấu được trộn với nhau trước khi thêm vào phiến.

Phương pháp này được ứng dụng trong sản xuất các kit thương phẩm định lượng hàm lượng kháng thể của vi rút viêm gan A, viêm gan B trong huyết thanh. Sử dụng nhiều trong kiểm tra công hiệu vắc xin viêm gan A, B theo phương pháp *in vivo*.

Direct C-ELISA kiểm tra kháng thể được mô tả chi tiết ở sơ đồ 15.46.6.



Ag: kháng nguyên; Ab: kháng thể; AB: kháng thể khác loại hoặc khác nguồn gốc với Ab; **Enz: Enzym gắn cộng hợp; S: cơ chất

Sơ đồ 15.46.6 - ELISA cạnh tranh trực tiếp kiểm tra kháng thể

3) ELISA cạnh tranh gián tiếp (Indirect C-ELISA)

Nguyên lý: Đầu tiên gắn một lượng kháng nguyên trùng với kháng nguyên cần kiểm tra lên phiến. Sau đó thêm kháng nguyên cần kiểm tra (pha ra một số nồng độ) và kháng thể đặc hiệu. Kháng nguyên cần kiểm tra sẽ phản ứng cạnh tranh với kháng nguyên đã gắn trên phiến. Sau đó thêm kháng thể thứ hai có gắn enzym, ủ, rửa và thêm cơ chất. Thêm dung dịch dùng phản ứng vào và đọc kết quả OD. Lúc đó giá trị OD sẽ tỷ lệ nghịch với hàm lượng kháng nguyên có trong mẫu tức mẫu có nồng độ kháng nguyên cao sẽ cho giá trị OD thấp và ngược lại vì thường thì phản ứng giữa kháng nguyên tự do với kháng thể xảy ra trước rồi mới đến phản ứng giữa kháng nguyên gắn bản với kháng thể.

Phương pháp này được áp dụng trong quy trình xác định công hiệu thành phần HBsAg của vắc xin viêm gan A-B phối hợp; Một số kit thương phẩm trong định lượng hàm lượng kháng sinh tồn dư trong vắc xin như gentamicin, neomycin...

HƯỚNG DẪN XỬ TRÍ CÁC VẤN ĐỀ THƯỜNG GẶP TRONG THỬ NGHIỆM ELISA (xem Bảng 15.46.1)

Bảng 15.46.1 - Các vấn đề thường gặp, nguyên nhân và hướng dẫn xử trí

STT	Các vấn đề thường gặp	Nguyên nhân	Hướng dẫn xử trí
1	Tín hiệu nền cao hoặc quá cao (đương tính giả)	Rửa phiến chưa đạt	- Xem lại bước rửa. - Bổ sung chất tẩy rửa (Tween 20 hoặc Triton X-100) vào đệm rửa; - Tăng số lần rửa; - Thêm 5 min để ngâm giữa các lần rửa. - Thêm các protein bão hòa vào dung dịch rửa.
		Hàm lượng enzym cộng hợp quá cao	Kiểm tra lại khâu pha loãng, chuẩn định lại nếu cần.
		Giai đoạn bão hòa phiến chưa đủ	Tăng hàm lượng protein bão hòa; Thay loại protein bão hòa khác; Tăng thời gian bão hòa.
		Thời gian ủ quá lâu	Giảm thời gian ủ.
		Có chất gây nhiễu trong mẫu kiểm tra	- Thêm mẫu chứng (control). - Tiến hành thử nghiệm thu hồi (recovery assay) để xác định mức độ ảnh hưởng của yếu tố gây nhiễu. - Thay phương pháp khác phù hợp hơn nếu cần (phương pháp <i>in vivo</i> ,...).
		Các đệm sử dụng bị nhiễm (đệm gắn phiến, đệm bão hòa, đệm rửa và đệm pha loãng...)	Pha lại các đệm.
		Giấy dán phiến hoặc các hóa chất sử dụng bị nhiễm	- Sử dụng giấy dán phiến riêng biệt ở từng bước ủ; - Kiểm tra lại hóa chất và pha lại hoặc thay loại đảm bảo chất lượng.
2	Không có tín hiệu hoặc tín hiệu quá thấp	Các hóa chất thêm vào không đúng với yêu cầu hoặc pha sai	- Nhắc lại thử nghiệm; - Tính toán lại và pha mới các hóa chất (các đệm, chất chuẩn, mẫu) sử dụng trong thử nghiệm.
		Enzym bị nhiễm chất ức chế (azid của HRP hay phosphat của PA)	Pha lại hóa chất.
		Kháng thể sử dụng không đủ lượng	- Tăng hàm lượng; - Kiểm tra lại chuẩn; - Sử dụng mẫu mới.
		Kháng thể gắn phiến (hoặc chất phân tích) gắn lên quá ít hoặc không gắn lên phiến	- Kiểm tra lại điều kiện chuẩn/phù hợp cho gắn phiến; - Tăng hàm lượng kháng thể/chất phân tích khi gắn phiến; - Pha kháng thể/chất phân tích trong đệm phosphat để đảm bảo không bị nhiễm protein tạp; - Thay đổi loại phiến gắn tốt hơn; - Thử sử dụng các phiến gắn dạng liên kết cộng hóa trị. - Tăng thời gian gắn phiến.
		Các đệm bị nhiễm	Pha lại.
		Mẫu kiểm tra hoặc chuẩn có chất ức chế (các tá chất Al^{3+} , ion kim loại nặng,...)	- Xử lý chất gây nhiễu bằng phương pháp phù hợp; - Thay đổi phương pháp khác (<i>in vivo</i>) hoặc một phương pháp hóa miễn dịch phù hợp hơn.
		Giấy dán phiến không đạt yêu cầu hoặc do sử dụng lại quá nhiều lần	Sử dụng loại giấy dán phiến chuyên dụng và thay mới ở từng bước ủ.
		Thời gian ủ cơ chất không đủ	Tăng thời gian ủ cơ chất.
		Phiến sau gắn bảo quản bị hỏng	- Gắn lại; - Ngâm phiến trong dung dịch đường sucrose 2 % từ 5 min đến 10 min trước khi làm khô phiến.
		Nhiệt độ ủ không đảm bảo	- Các hóa chất trước khi làm phải được đưa về nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ ủ trước khi thêm vào giếng. - Sử dụng các thiết bị kiểm soát nhiệt độ ủ chuyên dụng trong các bước ủ (máy ủ phiến; tủ ấm, tủ lạnh, tủ mát).

STT	Các vấn đề thường gặp	Nguyên nhân	Hướng dẫn xử trí
3	Đường chuẩn lên nhưng lại có sự sai khác giữa các điểm (các độ pha cho kết quả không tuyến tính hoặc không tạo độ tuyến tính)	Nồng độ enzym cộng hợp không đủ Kháng thể gắn phiến hoặc chất phân tích gắn lên không đều Kháng thể phát hiện không đủ Thời gian cho enzym phân hủy cơ chất không đủ Quy trình làm bị sai Tính và xây dựng đường chuẩn của chuẩn sai	Kiểm tra lại cách pha, chuẩn định lại nếu cần. - Pha kháng thể/chất phân tích trong đệm phosphat để đảm bảo không bị nhiễm protein tạp; - Thay đổi loại phiến gắn tốt hơn. Kiểm tra lại cách pha, chuẩn định lại nếu cần. Tăng thời gian ủ. Kiểm tra lại và chuẩn thức hóa lại. Tính lại và dựng đường chuẩn mới.
4	Sai số về giá trị OD của các giếng lặp lại quá lớn	Rửa phiến chưa đạt Lớp kháng thể (hoặc chất phân tích) gắn không đồng đều do quy trình làm bị lỗi hoặc phiến gắn không tốt	- Xem lại quy trình rửa. - Nếu rửa bằng máy thì kiểm tra lại hệ thống rửa (thông rửa các đường ống hút/nhà); - Thêm 5 min để ngâm giữa các lần rửa. - Pha lại kháng thể gắn trong đệm không lẫn protein tạp; - Kiểm tra các đệm pha gắn phiến tại các pH khác nhau; - Kiểm tra lại thể tích, thời gian, phương pháp gắn; bão hòa của các hóa chất sử dụng đã phù hợp chưa. - Chọn thời gian ủ phiến gắn qua đêm; - Tăng thời gian bão hòa phiến; - Sử dụng các phiến, dụng cụ làm ELISA chuyên dụng.
		Giấy dán phiến không đạt yêu cầu hoặc do sử dụng lại quá nhiều lần	- Sử dụng loại giấy dán phiến chuyên dụng và thay mới ở từng bước ủ.
		Các đệm sử dụng bị nhiễm	Pha lại.
5	Độ lặp lại kết quả giữa các lần làm thử nghiệm quá thấp	Rửa phiến chưa đạt Thay đổi trong nhiệt độ ủ Do thay đổi quy trình	- Xem lại quy trình rửa. - Nếu rửa bằng máy thì kiểm tra lại hệ thống rửa (thông rửa các đường ống hút/nhà); - Ngâm thêm 5 min giữa các lần rửa. - Các hóa chất trước khi làm phải được đưa về nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ ủ trước khi thêm vào giếng. - Sử dụng các thiết bị kiểm soát nhiệt độ ủ chuyên dụng trong các bước ủ (máy ủ phiến; tủ ấm, tủ lạnh, tủ mát). Đảm bảo tuân thủ theo đúng quy trình chuẩn.
		Giấy dán phiến không đạt yêu cầu hoặc do sử dụng lại quá nhiều lần	Sử dụng loại giấy dán phiến chuyên dụng và thay mới ở từng bước ủ.
		Tính toán sai đường cong chuẩn	- Tính lại; - Xây dựng đường chuẩn mới; - Sử dụng mẫu chứng nội bộ (internal control) để kiểm tra lại quy trình và chất chuẩn.
6	Không có tín hiệu ở những mẫu mong đợi nhưng chuẩn vẫn tốt	Chất phân tích không có trong mẫu; hoặc hàm lượng quá thấp hoặc có chất ức chế hoặc mẫu phân tích và chuẩn không tương thích. Hoặc chất nền của mẫu làm che đi sự phát hiện.	- Kiểm tra lại sự phù hợp của chuẩn và mẫu; - Tính lại hàm lượng chất phân tích trong mẫu và pha lại; - Kiểm soát kỹ lại quy trình và lặp lại thử nghiệm; - Tìm và xử lý chất ức chế; - Thay đổi phương pháp khác. - Xem lại "recovery assay" để xác định yếu tố che phủ.

STT	Các vấn đề thường gặp	Nguyên nhân	Hướng dẫn xử trí
7	Không có sự thay đổi về kết quả (OD không thay đổi giữa các độ pha)	Hàm lượng chất phân tích quá cao	Pha lại mẫu và làm lại.
		Hàm lượng chất gắn phiên quá cao	Tính toán và pha lại.
8	Màu lên nhưng đọc bị thấp	Chọn sai bước sóng	- Kiểm tra lại dải bước sóng tối đa phù hợp với từng loại cơ chất sử dụng (*). - Kiểm tra lại filter đọc.
9	Kết quả bị ngược hoặc sai	Đọc quá thời gian quy định	- Làm lại và kiểm tra lại thời gian đọc phù hợp.
		Đọc sai bước sóng	- Kiểm tra lại dải bước sóng tối đa phù hợp với từng loại cơ chất sử dụng (*).
		Ù cơ chất quá lâu	- Làm lại và kiểm tra lại thời gian ù phù hợp. - Kiểm tra lại cơ chất và thời gian ù.

(*): Các loại cơ chất và bước sóng phù hợp:

Cơ chất	pNPP (p- nitrophenol phosphat)	BluePhos/ BCIP	ABTS (acid 2,2-Azino- di (3-ethyl- benzathiazolin) sulphonic)	SureBlue/ TMB (3,5,3',5'- Tetramethyl benzidin)	SureBlue Reserve™
Enzym	AP (Alkaline-phosphat)	AP	HRP (Horseradish Peroxidase)	HRP	HRP
Màu trước khi cho dung dịch dừng phản ứng	Vàng	Xanh	Xanh lá cây	Xanh	Xanh
Bước sóng hấp thụ tối đa trước khi cho dung dịch dừng phản ứng	(405 - 410) nm	(595 - 650) nm	(405 - 410) nm	650 nm	650 nm
Hóa chất dừng phản ứng	5 % EDTA	Dung dịch BluePhos STOP	Dung dịch ABTS STOP	Dung dịch TMB STOP	Dung dịch TMB STOP
Màu sau khi cho dung dịch dừng phản ứng	Vàng	Xanh tím	Xanh lá cây	Vàng	Vàng
Bước sóng hấp thụ tối đa sau khi cho dung dịch dừng phản ứng	(405 - 410) nm	(595 - 650) nm	(405 - 410) nm	450 nm	450 nm

Ngoài ra để đảm bảo kết quả ELISA được chuẩn xác và ít bị nhiễu thì cần phải đặc biệt chú ý đến các vấn đề về dụng cụ, thiết bị, thao tác trong thử nghiệm.

Yêu cầu đối với dụng cụ, thiết bị sử dụng trong thử nghiệm ELISA

Dàn máy ELISA phải được hiệu chuẩn, bảo dưỡng định kỳ. Dụng cụ làm ELISA có rất nhiều, trong đó đặc biệt chú ý là Pipetman (các loại đơn và đa kênh) phải được hiệu chuẩn định kỳ. Cách hiệu chuẩn như sau: Mỗi loại pipetman, chọn 3 khoảng thể tích để hiệu chuẩn (thấp nhất, ở giữa và cao nhất), ví dụ pipet loại (10 - 100) µl thì sẽ chọn thể tích để chuẩn định ở 10 µl, 50 µl và 100 µl. Tại mỗi thể tích sẽ đo 10 lần rồi tính độ lệch chuẩn CV (%). Tiêu chuẩn cho

pipet được phép sử dụng làm ELISA: tại độ tin cậy 95 %, CV < (2 - 3) %. Ngoài khoảng này không được phép sử dụng. Với pipet đa kênh việc hiệu chuẩn cũng tiến hành tương tự trên từng kênh. Pipet đa kênh chỉ được sử dụng khi tất cả các kênh đều đạt yêu cầu về độ lệch chuẩn quy định (tại độ tin cậy 95%, CV < 2 - 3 %).

Các dụng cụ đựng hóa chất (chai lọ, tuýp pha loãng hoặc các máng nhựa...): Phải được đánh dấu và tách riêng một bộ.

Cách thao tác khi hút mẫu sử dụng pipetman (Ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả thử nghiệm)

Gắn thật chặt các đầu côn vào pipet. Nên sử dụng pipet và đầu côn đúng chủng loại, tránh tình trạng đầu đầu côn của một hãng, pipet của một hãng khác...

Tráng đầu côn vài lần bằng cách hút lên xuống để tránh sai số do sức căng bề mặt của nước.

Hút 2 kỳ, nhả 1 kỳ. Hút phải từ từ để chất lỏng lên đều đạt trạng thái cân bằng về thể tích và không tạo bọt khí ở giữa. Nhả từ từ về 1 kỳ. Khi nhả nghiêng đầu đầu côn về vị trí của giếng, không chạm sát dung dịch có sẵn trong giếng hoặc đáy giếng để tránh lượng chất lỏng có trong giếng bám vào bên ngoài đầu côn gây sai số.

Thay đổi đầu côn khi thay đổi độ pha hoặc hóa chất.

Sử dụng pipet trong giới hạn khuyến cáo. Ví dụ: giới hạn của pipet là (10 - 100) μl thì không sử dụng để hút các thể tích < 10 μl hoặc > 100 μl .

Nếu hóa chất có độ nhớt thì hút từ từ để thể tích về trạng thái cân bằng mới nhả ra khỏi dịch lỏng.

Trong khi hút nếu thấy có bọt khí thì phải hút lại. Hút lại vài lần vẫn còn bọt khí thì phải thay đầu côn mới.

Cách pha loãng mẫu để giảm sai số

Tránh pha loãng nhiều bước.

Ví dụ, nếu pha 1/1000 chỉ nên pha 2 bước:

Bước 1: Pha 1/100 (1 ml mẫu + 99 ml dung dịch pha loãng);

Bước 2: Lấy 1 ml của độ pha 1/100 + 9 ml dung dịch pha loãng.

Tránh sử dụng thể tích mẫu quá ít khi pha loãng mẫu.

Mẫu phân tích nếu có hàm lượng không quá cao ở mức nguyên chất hoặc đậm đặc; mẫu có nhiều thành phần tá chất, tá dược, chất bảo quản, protein tạp khác như vắc xin, sinh phẩm thì nên sử dụng lượng thể tích theo đơn vị ml.

Ví dụ: Mẫu cần pha 1/100 thì không nên pha: 1 ml mẫu + 99 ml dung dịch pha loãng mà nên pha lượng thể tích nhiều hơn: 5 ml mẫu + 495 ml dung dịch pha loãng.

Các mẫu có độ tinh sạch và nồng độ đậm đặc cao, hàm lượng hàng trăm đến hàng nghìn $\mu\text{g/ml}$: Nồng độ mẫu cần dùng chỉ 1 $\mu\text{g/ml}$ thì khi pha không nên lấy thể tích dưới 2 μl ($\leq 2 \mu\text{l}$), nên lấy từ 10 μl trở lên.

Pha loãng mẫu trên tuýp nhựa hoặc tuýp thủy tinh: Dụng cụ pha phải thật sạch; trộn, lắc kỹ trước khi hút; thay đầu côn khi chuyển độ pha hoặc hóa chất...

Pha loãng mẫu trên phiến 96 giếng: Phải sử dụng pipet đa kênh đạt chuẩn. Thao tác như sau: Trộn mẫu bằng hút lên xuống vài lần (4 đến 5 lần) rồi hút lượng hóa chất cần lấy và chuyển sang độ pha loãng cao hơn kế tiếp.

Lưu ý

Thao tác đều tay, tránh bọt khí, tránh thể tích không đều giữa các kênh và không đồng đều về số lần trộn... dẫn đến sai số hệ thống hoặc sai số ở một hoặc một số độ pha.

Trong thời gian trộn có thể xảy ra: hoặc phản ứng giữa kháng nguyên, kháng thể; hoặc phản ứng hấp phụ lên phiến pha mẫu dẫn đến làm mất (thiếu) đi một lượng chất phản ứng nhất định. Để tránh điều này nên sử dụng các dụng cụ pha loãng có khả năng hấp phụ kém như polypropylen hoặc thủy tinh hoặc khi chuyển độ pha thì hút đồng thời vào phiến thử nghiệm luôn. Ví dụ: Cần pha loãng bậc 5 ra 10 độ pha, khi pha mẫu từ độ pha 5^{-1} sang 5^{-2} mà độ pha 5^{-1} cũng sử dụng trong thử nghiệm thì khi hút mẫu từ 5^{-1} sẽ hút luôn cả mẫu vào phiến thử nghiệm. Cách làm sẽ tương tự trong suốt quy trình pha loãng...

Ví dụ về một số quy trình thực hiện kỹ thuật ELISA

Nguyên vật liệu, dụng cụ và thiết bị

Kháng nguyên.

Kháng thể cộng hợp gắn enzym.

Dung dịch đệm pha loãng kháng nguyên.

Dung dịch block (cố định) phiến.

Dung dịch rửa.

Dung dịch cơ chất.

Dung dịch dừng phản ứng.

Giàn máy ELISA.

Pipetman các loại.

Đầu côn các loại từ 10 μl đến 1000 μl .

Máng nhựa.

Phiến ELISA chuyên dụng;

Phiến 96 giếng đáy tròn (để pha loãng mẫu).

Tuýp effendorf 1,5 ml đến 2 ml.

Chai thủy tinh các loại 100 ml đến 1000 ml.

Giấy dán phiến.

Tủ lạnh.

Tủ ấm 37 °C.

Các quy trình

QUY TRÌNH: *ELISA trực tiếp (Direct ELISA Representative Protocol), quy trình tự gắn phiến*

I. Gắn phiến

Nhỏ 100 μl kháng nguyên đã pha loãng (có hàm lượng từ 1 $\mu\text{g/ml}$ đến 20 $\mu\text{g/ml}$) trong dung dịch đệm phù hợp vào mỗi giếng của phiến gắn ELISA chuyên dụng.

Ủ ở 2 °C đến 8 °C qua đêm (khoảng 16 h đến 18 h).

II. Cố định phiến sau gắn

Đổ hết dung dịch trong phiến.

Thêm 300 μl dung dịch bão hòa phiến vào các giếng.

Ủ 1 h đến 2 h ở nhiệt độ phòng. Trường hợp làm ngay và để rút ngắn thời gian, ủ ở 37 °C trên máy lắc nhẹ trong 15 min là có thể làm được. Nếu chưa làm ngay có thể ngâm lâu hơn.

Rửa sạch phiến bằng dung dịch rửa (thường là PBS 0,05 % Tween 20) 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 μl /giếng.

Lần rửa cuối ngâm 10 min.

III. Thêm kháng thể cộng hợp gắn enzym

Thêm 100 μl kháng thể cộng hợp gắn enzym vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h (tốt nhất ủ ở 37 °C). Một số phản ứng có thể phải ủ 3 h đến 4 h phản ứng mới đạt tối ưu.

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 μl /giếng.

Lần rửa cuối ngâm 10 min.

IV. Thêm cơ chất

Nhỏ 100 μl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.

Ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C đến 28 °C trong 10 min đến 20 min.

Thêm 100 μl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc kết quả OD trên máy đọc ELISA chuyên dụng. Thời gian đọc không quá 30 min từ khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng.

Tùy theo loại cơ chất sử dụng trong thử nghiệm để chọn bước sóng phù hợp.

QUY TRÌNH II: ELISA gián tiếp (Indirect ELISA Representative Protocol), quy trình tự gắn phiến

I. Gắn phiến

Nhỏ 100 µl kháng nguyên đã pha loãng (có hàm lượng từ 1 - 20 µg/ml) trong dung dịch đệm phù hợp vào mỗi giếng của phiến gắn ELISA chuyên dụng.

Ủ ở 2 °C đến 8 °C qua đêm (khoảng 16 h đến 18 h).

II. Cố định phiến sau gắn

Đổ hết dung dịch trong phiến.

Thêm 300 µl dung dịch bão hòa phiến vào các giếng.

Ủ 1 h đến 2 h ở nhiệt độ phòng. Trường hợp làm ngay và để rút ngắn thời gian, ủ ở 37 °C trên máy lắc nhẹ trong 15 min là có thể làm được. Nếu chưa làm ngay có thể ngâm lâu hơn.

Rửa sạch phiến bằng dung dịch rửa (thường là PBS - 0,05 % Tween 20) 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

III. Thêm kháng thể 1 (primary antibody).

Thêm 100 µl kháng thể cộng hợp không gắn enzym vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

IV. Thêm kháng thể 2 cộng hợp gắn enzym

Thêm 100 µl kháng thể cộng hợp gắn enzym vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1h (tốt nhất ủ ở 37 °C). Một số phản ứng có thể phải ủ 3 h đến 4 h phản ứng mới đạt tối ưu.

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

V. Thêm cơ chất

Nhỏ 100 µl cơ chất vào mỗi giếng.

Ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C đến 28 °C trong 15 min đến 30 min, tránh ánh sáng.

Thêm 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc kết quả OD trên máy đọc ELISA chuyên dụng. Thời gian đọc không quá 30 min từ khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng.

Tùy theo loại cơ chất sử dụng trong thử nghiệm để chọn bước sóng phù hợp.

QUY TRÌNH III A: ELISA Sandwich trực tiếp (direct sandwich/capture ELISA Representative Protocol), quy trình tự gắn phiến.

I. Gắn phiến

Nhỏ 100 µl kháng thể 1 (capture antibody) đã pha loãng (có hàm lượng từ 1 - 15 µg/ml) trong dung dịch đệm phù hợp vào mỗi giếng của phiến gắn ELISA chuyên dụng.

Ủ ở 2 °C đến 8 °C qua đêm (khoảng 16 h đến 18 h).

II. Cố định phiến sau gắn

Đổ hết dung dịch trong phiến.

Thêm 300 µl dung dịch bão hòa phiến vào các giếng.

Ủ 1 h đến 6 h ở nhiệt độ phòng. Trường hợp làm ngay và để rút ngắn thời gian, ủ ở 37 °C trên máy lắc nhẹ trong 15 min đến 60 min là có thể làm được. Nếu chưa làm ngay có thể ngâm lâu hơn.

Rửa sạch phiến bằng dung dịch rửa (thường là PBS - 0,05 % Tween 20) 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

III. Thêm kháng nguyên của mẫu

Thêm 100 µl kháng nguyên của mẫu thử vào tất cả các giếng. Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

IV. Thêm kháng thể 2 cộng hợp gắn Enzym.

Thêm 100 µl kháng thể 2 vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

V. Thêm cơ chất

Nhỏ 100 µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.

Ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C đến 28 °C trong 15 min đến 30 min, tránh ánh sáng.

Thêm 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc kết quả OD trên máy đọc ELISA chuyên dụng. Thời gian đọc không quá 30 min từ khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng. Tùy theo loại cơ chất sử dụng trong thử nghiệm để chọn bước sóng phù hợp.

QUY TRÌNH III B: ELISA Sandwich gián tiếp (indirect sandwich/capture ELISA Representative Protocol), quy trình tự gắn phiến

I. Gắn phiến

Nhỏ 100 µl kháng nguyên đã pha loãng (có hàm lượng từ 1 - 20 µg/ml) trong dung dịch đệm phù hợp vào mỗi giếng của phiến gắn ELISA chuyên dụng.

Ủ ở 2 °C đến 8 °C qua đêm (khoảng 16 h đến 18 h).

II. Cố định phiến sau gắn

Đổ hết dung dịch trong phiến.

Thêm 300 µl dung dịch bão hòa phiến vào các giếng.

Ủ 1 h đến 6 h ở nhiệt độ phòng. Trường hợp làm ngay và để rút ngắn thời gian, ủ ở 37 °C trên máy lắc nhẹ trong 15 - 60 min. Nếu chưa làm ngay có thể ngâm lâu hơn.

Rửa sạch phiến bằng dung dịch rửa (thường là PBS - 0,05 % Tween 20) 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

III. Thêm kháng nguyên của mẫu

Thêm 100 µl kháng nguyên của mẫu thử vào tất cả các giếng. Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

IV. Thêm kháng thể sơ cấp

Thêm 100 µl kháng thể 2 vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h đến 2 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

V. Thêm kháng kháng thể 2 cộng hợp gắn enzym

Thêm 100 µl kháng thể cộng hợp gắn enzym vào tất cả các giếng.

Dán phiến và ủ ở nhiệt độ phòng 1 h (tốt nhất ủ ở 37 °C).

Một số phản ứng có thể phải ủ 3 h đến 4 h phản ứng mới đạt tối ưu.

Đổ hết dung dịch có trong giếng và rửa phiến bằng dung dịch rửa 3 lần đến 5 lần, mỗi lần khoảng 300 - 500 µl/giếng. Lần rửa cuối ngâm 10 min.

VI. Thêm cơ chất

Nhỏ 100 µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.

Ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C đến 28 °C trong 15 min đến 30 min, tránh ánh sáng.

Thêm 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Đọc kết quả OD trên máy đọc ELISA chuyên dụng. Thời gian đọc không quá 30 min từ khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng.

Tùy theo loại cơ chất sử dụng trong thử nghiệm để chọn bước sóng phù hợp.

15.47 KIỂM TRA MYCOPLASMA TRONG VẮC XIN/ SINH PHẨM (Phương pháp nuôi cấy hoặc dùng chỉ thị tế bào)

Chi *Mycoplasma* có hơn 120 loài, chúng là một nhóm các vi khuẩn có kích thước nhỏ, không có thành tế bào, có kích thước và hình dạng khác nhau, không bắt màu Gram.

Mycoplasma thường gây ra các nhiễm trùng nặng cho tế bào và mô. Nhiễm *Mycoplasma* trong tế bào nuôi trong một thời gian dài mà không hề có biểu hiện tổn thương bên ngoài tế bào, nó ảnh hưởng tới chuyển hoá và sự phát triển bình thường của tế bào. Nhiễm *Mycoplasma* trong tế bào nuôi thường không gây đục môi trường.

Kiểm tra *Mycoplasma* là một phần của kiểm tra các tác nhân ngoại lai có nguồn gốc từ chủng virus sản xuất vắc xin/sinh phẩm mà trong quá trình sản xuất sử dụng tế bào nuôi.

Phạm vi áp dụng

Áp dụng để kiểm tra:

Tế bào gốc giống, tế bào sản xuất, chủng virus gốc giống, chủng virus sản xuất, tế bào sử dụng làm chứng;

Mề gặt virus, vắc xin bán thành phẩm, vắc xin bán thành phẩm cuối cùng, vắc xin thành phẩm mà theo Tổ chức Y tế Thế giới cần phải kiểm tra *Mycoplasma*.

Các phương pháp

Thử nghiệm kiểm tra *Mycoplasma* trong vắc xin/sinh phẩm có thể được thực hiện bằng các phương pháp sau:

Phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng và môi trường đặc.

Phương pháp dùng chỉ thị tế bào.

Cả hai phương pháp nuôi cấy và phương pháp dùng chỉ thị tế bào đều được sử dụng để kiểm tra *Mycoplasma* trong tế bào gốc giống, tế bào sản xuất, chủng virus gốc giống, chủng virus sản xuất, tế bào sử dụng làm chứng.

Khi kiểm tra *Mycoplasma* trong mề gặt virus, vắc xin bán thành phẩm hoặc vắc xin thành phẩm thì sử dụng phương pháp nuôi cấy. Phương pháp dùng chỉ thị tế bào có thể cũng được sử dụng.

Kỹ thuật khuếch đại acid nucleic (Nucleic acid amplification techniques: NAT) có thể dùng để thay thế một trong hai phương pháp trên. Tuy nhiên, nên thẩm định trước khi dùng về ít nhất hai chỉ số: Độ đặc hiệu và giới hạn phát hiện.

Phương pháp dựa trên hoạt động của enzym cũng có thể sử dụng nhưng phải thẩm định để chứng tỏ nó có khả năng phát hiện *Mycoplasma* tương đương như phương pháp nuôi cấy và phương pháp dùng chỉ thị tế bào. Các phương pháp khác có thể được sử dụng nếu cơ quan Kiểm định Quốc gia đã chấp thuận.

Phương pháp nuôi cấy

Môi trường sử dụng: Sử dụng cả hai loại môi trường đặc và môi trường lỏng với số lượng đủ lớn để đảm bảo phát hiện được số lượng nhỏ *Mycoplasma* có thể có trong vắc xin/sinh phẩm. Nên sử dụng ít nhất hai môi trường lỏng, một để đánh giá tính chất lên men glucose, một để đánh giá tính chất thủy phân arginin.

Môi trường lỏng cần chứa đỏ phenol.

Kiểm tra dinh dưỡng môi trường: Cần kiểm tra khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho chủng phát triển (kiểm tra dinh dưỡng) của từng loạt môi trường.

Các loài *Mycoplasma* sử dụng cho kiểm tra dinh dưỡng môi trường như sau:

Acholeplasma laidlawii (nếu trong quá trình sản xuất vắc xin/sinh phẩm có sử dụng kháng sinh); *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae* (hoặc những loài *Mycoplasma* có lên men D-glucose khác).

Nên sử dụng ít nhất hai chủng: Một chủng lên men glucose, một chủng thủy phân arginin. Các chủng này không được cấy chuyển quá 15 lần.

Quy trình thực hiện:

Cấy chủng vào môi trường theo tỷ lệ không quá 100 CFU cho một đĩa đường kính 60 mm có chứa 9 ml môi trường đặc hoặc một chai chứa 100 ml môi trường lỏng.

Ủ các chai và đĩa môi trường này ở nhiệt độ tương tự như trong thử nghiệm kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm đối với *Mycoplasma*.

Lấy 0,2 ml từ mỗi chai môi trường lỏng, cấy chuyển sang môi trường đặc ở các thời điểm giống như trong thử nghiệm kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm đối với *Mycoplasma*.