

PHỤ LỤC 05
DANH MỤC TÀI LIỆU ÔN TẬP – ĐỐI TƯỢNG CỬ NHÂN KỸ THUẬT
XÉT NGHIỆM Y HỌC/XÉT NGHIỆM Y HỌC
PHẦN THI PHÒNG VẤN - KIẾN THỨC CHUYÊN NGÀNH
(Áp dụng trong Kỳ tuyển dụng lao động hợp đồng tại Bệnh viện Đa khoa
tỉnh Quảng Ninh, năm 2025)

1. Bài 1: Tổng quan về an toàn sinh học phòng xét nghiệm, Tr7-13. “*An toàn sinh học tại phòng xét nghiệm An toàn sinh học cấp IP*”. Nhà xuất bản Y học, 2014

2. Bài 4: Các yêu cầu đối với phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp I, cấp II theo quy định của Bộ y tế, tr 36-45. “*An toàn sinh học tại phòng xét nghiệm An toàn sinh học cấp IP*”. Nhà xuất bản Y học, 2014

3. Chương 10: Phương pháp miễn dịch phát quang và hệ thống xét nghiệm miễn dịch, tr 156-181. “*Kỹ thuật và thiết bị xét nghiệm y học*”. Nhà xuất bản Y học, 2023

(có file scan gửi kèm)

---HẾT---

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

An toàn sinh học

Tại phòng xét nghiệm
An toàn sinh học cấp II



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

Bài 1

TỔNG QUAN VỀ AN TOÀN SINH HỌC PHÒNG XÉT NGHIỆM

MỤC TIÊU HỌC TẬP

Sau bài này, học viên có khả năng:

1. Trình bày được một số khái niệm liên quan đến ATSH, các tiêu chí chính để phân loại VSV theo nhóm nguy cơ.
2. Trình bày được các lý do phải đảm bảo ATSH trong PXN.
3. Liệt kê được các quy định, hướng dẫn về ATSH đã được ban hành tại Việt Nam.
4. Trình bày được các yếu tố nhằm đảm bảo ATSH và các bước cần thực hiện để PXN được cấp giấy chứng nhận ATSH.

Bài học này đề cập đến các thông tin cơ bản liên quan đến an toàn sinh học phòng xét nghiệm như: một số khái niệm, phân loại vi sinh vật theo nhóm nguy cơ, cấp độ an toàn sinh học, lý do phải đảm bảo an toàn sinh học, các quy định về an toàn sinh học tại Việt Nam và các yêu cầu về đảm bảo an toàn sinh học.

1. MỘT SỐ KHÁI NIỆM LIÊN QUAN ĐẾN AN TOÀN SINH HỌC

An toàn sinh học (Biosafety): là thuật ngữ được sử dụng để mô tả các nỗ lực làm giảm hoặc loại trừ các nguy cơ tiềm tàng của công nghệ sinh học và các sản phẩm của nó.

An toàn sinh học phòng xét nghiệm (Laboratory Biosafety): là thuật ngữ được sử dụng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết để ngăn ngừa những phơi nhiễm không mong muốn hoặc vô tình làm thất thoát tác nhân gây bệnh (TNGB) và độc tố. Tài liệu này tập trung vào an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm (gọi tắt là ATSH)

An ninh sinh học (Biosecurity): là những biện pháp an ninh cho tổ chức hay cá nhân được thiết lập để ngăn chặn sự mất mát, đánh cắp, lạm dụng, đánh tráo hoặc cố tình phóng thích mầm bệnh và độc tố.

Tác nhân sinh học (Agent): gồm các vi sinh vật và các sinh vật biến đổi gen, ký sinh trùng trên người có khả năng gây ra nhiễm trùng, dị ứng hoặc gây độc.

Hàng rào bảo vệ thứ nhất (Primary Barriers): từ ATSH, trang bị bảo hộ cá nhân, dụng cụ trợ pipet, hộp đựng chất thải sắc nhọn, cốc ly tâm an toàn, bơm kim tiêm tự khóa.

Hàng rào bảo vệ thứ hai (Secondary Barriers): cơ sở vật chất, thiết kế PXN (hệ thống thông khí, dòng khí định hướng, áp suất âm, bồn rửa tay, vòi rửa mắt, cửa tự đóng, nồi hấp tiệt trùng...).

2. PHÂN LOẠI VI SINH VẬT GÂY BỆNH LÂY NHIỄM THEO NHÓM NGUY CƠ

Để đánh giá mức độ nguy hiểm của các loại VSV gây bệnh truyền nhiễm đối với nhân viên PXN và môi trường xung quanh, Tổ chức Y tế Thế giới đã phân chia các loại VSV này thành bốn nhóm nguy cơ. Các tiêu chí quan trọng để phân loại các VSV gây bệnh truyền nhiễm theo nhóm nguy cơ bao gồm:

- Khả năng gây bệnh của VSV;
- Liều lây nhiễm;
- Đường lây nhiễm;
- Yếu tố vật chủ của VSV;
- Sự sẵn có của các biện pháp phòng và điều trị bệnh hiệu quả.

Dựa vào các tiêu chí trên, bốn nhóm nguy cơ của VSV gây bệnh truyền nhiễm được mô tả như sau:

Nhóm nguy cơ 1: là nhóm chưa hoặc ít có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể và cộng đồng, bao gồm các loại vi sinh vật chưa phát hiện thấy khả năng gây bệnh cho người.

Ví dụ: *Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberi*...

Nhóm nguy cơ 2: là nhóm có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể ở mức độ trung bình nhưng nguy cơ cho cộng đồng ở mức độ thấp bao gồm các loại vi sinh vật có khả năng gây bệnh nhưng ít gây bệnh nặng cho người, có khả năng lây truyền sang người và có biện pháp phòng, chống lây nhiễm, điều trị hiệu quả trong trường hợp mắc bệnh.

Ví dụ: Virus viêm gan B, *Salmonella*...

Nhóm nguy cơ 3: là nhóm có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể cao nhưng nguy cơ cho cộng đồng ở mức độ trung bình bao gồm các loại vi sinh vật có khả năng gây bệnh nặng cho người, có khả năng lây truyền sang người và có biện pháp phòng, chống lây nhiễm, điều trị hiệu quả trong trường hợp mắc bệnh.

Ví dụ: Vi khuẩn lao, virus Hanta, virus cúm A/H5N1, SARS, virus HIV...

Nhóm nguy cơ 4: là nhóm có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể và cộng đồng ở mức độ cao bao gồm các loại vi sinh vật có khả năng gây bệnh nặng cho người, có khả năng lây truyền sang người và chưa có biện pháp phòng, chống lây nhiễm, điều trị hiệu quả trong trường hợp mắc bệnh.

Ví dụ: Virus Ebola, Poxvirus – Variola...

Theo khuyến cáo của WHO, các nước nên xây dựng bảng phân loại theo nhóm nguy cơ đối với các VSV gây bệnh truyền nhiễm xuất hiện ở mỗi nước dựa trên các tiêu chí đề cập ở trên. Do có rất nhiều các tiêu chí cần cân nhắc khi xây dựng bảng phân loại VSV gây bệnh theo nhóm nguy cơ nên bảng phân loại này sẽ khác nhau ở mỗi nước và

chỉ nên áp dụng ở quốc gia đó. Tại Việt Nam, Bộ Y tế cũng đã ban hành thông tư số 07/2012/TT-BYT ngày 14/05/2012 quy định danh mục VSV gây bệnh truyền nhiễm theo nhóm nguy cơ và cấp độ ATSH phù hợp kỹ thuật xét nghiệm.

3. CẤP ĐỘ AN TOÀN SINH HỌC PHÒNG XÉT NGHIỆM

Để tiến hành xét nghiệm các VSV ở các nhóm nguy cơ khác nhau, hiện nay Tổ chức Y tế Thế giới và nhiều nước phân loại các PXN thành bốn cấp độ ATSH (BSL). Tuy nhiên, cấp độ ATSH trong một số trường hợp không tương ứng hoàn toàn với nhóm nguy cơ VSV vì còn liên quan đến kỹ thuật xét nghiệm được tiến hành. Nhóm nguy cơ VSV chỉ là một trong những yếu tố cần cân nhắc để xác định cấp độ ATSH phù hợp cho PXN. Việc đánh giá nguy cơ sẽ góp phần quan trọng trong việc xác định cấp độ ATSH phù hợp cho mỗi PXN.

Tại Việt Nam, theo Nghị định số 92/2010/NĐ-CP, có 4 cấp độ ATSH của PXN, đó là cấp I, cấp II, cấp III và cấp IV. Thông tư số 07/2012/TT-BYT của Bộ Y tế cũng quy định cấp độ ATSH phù hợp với tác nhân gây bệnh và kỹ thuật xét nghiệm tại PXN. Các yêu cầu đối với PXN ở các cấp độ ATSH cấp I, II, III, IV bao gồm: cơ sở vật chất, trang thiết bị, nhân sự, thực hành, phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố ATSH.

4. LÝ DO PHẢI ĐẢM BẢO AN TOÀN SINH HỌC TRONG PHÒNG XÉT NGHIỆM

Nguy hiểm luôn tiềm ẩn và có thể xảy ra trong PXN như việc lây nhiễm TNGB cho nhân viên PXN, các thương tích vật lý do vật sắc nhọn, điện, cháy, nổ hay việc nhiễm các loại hóa chất độc hại, chất phóng xạ ion hóa... Một trong những bằng chứng rõ ràng cho thấy nguy hiểm luôn tiềm ẩn và có thể xảy ra trong PXN chính là các số liệu dịch tễ học về các trường hợp lây nhiễm liên quan đến PXN. Tổng hợp số liệu nghiên cứu về các trường hợp lây nhiễm liên quan đến PXN từ năm 1930 đến năm 2004 của các tác giả cho thấy có 5.527 trường hợp lây nhiễm liên quan đến PXN, trong đó có 204 ca tử vong (Biological Safety: Principle and Practices, Diane O. Fleming and Debra L. Hunt, 2006). Một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng những người làm việc trong PXN có nguy cơ mắc một số bệnh truyền nhiễm cao hơn so với cộng đồng dân cư nói chung. Nhân viên PXN có thể bị lây nhiễm với các VSV gây bệnh truyền nhiễm qua bốn đường lây nhiễm thông thường, bao gồm: hô hấp; tiêu hóa; da, niêm mạc và máu, vết thương. Việc lưu giữ, xét nghiệm TNGB truyền nhiễm trong PXN có thể xảy ra nguy cơ làm thất thoát các TNGB hoặc độc tố của chúng ra môi trường.

An toàn sinh học trong PXN là yêu cầu bắt buộc theo luật, nghị định và các thông tư của Bộ Y tế.

5. CÁC QUY ĐỊNH VỀ AN TOÀN SINH HỌC TẠI VIỆT NAM

Trong Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm số 03/2007/QH12, ban hành ngày 21 tháng 11 năm 2007, Điều 24, 25 và 26 đã đưa ra các quy định về bảo đảm an toàn sinh học, quản lý mẫu bệnh phẩm, bảo vệ người làm việc trong PXN.

Ngày 30 tháng 8 năm 2010, Chính phủ đã ban hành Nghị định số 92/2010/NĐ-Cp quy định chi tiết thi hành Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm về bảo đảm an toàn sinh học tại PXN. Nghị định này quy định về các vấn đề sau:

- Phân loại VSV gây bệnh truyền nhiễm và PXN theo cấp độ ATSH;
- Điều kiện bảo đảm ATSH tại PXN;
- Thẩm quyền, hồ sơ, thủ tục cấp mới, cấp lại và thu hồi Chứng nhận đạt tiêu chuẩn ATSH;
- Kiểm tra ATSH;
- Phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố ATSH.

Bảng danh mục VSV gây bệnh truyền nhiễm theo nhóm nguy cơ và cấp độ ATSH phù hợp kỹ thuật xét nghiệm đã được Bộ Y tế ban hành kèm theo Thông tư số 07/2012/TT-BYT ngày 14 tháng 5 năm 2012. Danh mục này cho phép các PXN xác định được nhóm nguy cơ của VSV được tiến hành trong PXN và cấp độ ATSH của PXN phù hợp với các kỹ thuật xét nghiệm TNGB.

Thông tư số 25/2012/TT-BYT ngày 29/11/2012 của Bộ Y tế ban hành Quy chuẩn Kỹ thuật quốc gia về thực hành và ATSH tại PXN, trong đó đưa ra các yêu cầu cụ thể đối với các PXN ATSH từ cấp I đến cấp IV.

Thủ tục cấp mới, cấp lại giấy chứng nhận PXN đạt tiêu chuẩn ATSH được Bộ Y tế quy định trong Thông tư số 29/2012/TT-BYT ngày 04/12/2012.

Việc quản lý mẫu bệnh phẩm bệnh truyền nhiễm được Bộ Y tế quy định trong Thông tư số 43/2011/TT-BYT ngày 05/12/2011. Thông tư này quy định việc thu thập, bảo quản, đóng gói, vận chuyển, lưu giữ, sử dụng, nghiên cứu, trao đổi, tiêu hủy mẫu bệnh phẩm và điều kiện của cơ sở được phép bảo quản, lưu giữ, sử dụng, nghiên cứu, trao đổi, tiêu hủy mẫu bệnh phẩm chứa chất lây nhiễm loại A.

Quyết định số 43/2007/QĐ-BYT của Bộ Y tế ban hành Quy chế Quản lý chất thải y tế được áp dụng từ ngày 30/11/2007. Trong đó quy định chi tiết về việc phân loại chất thải lây nhiễm, phương pháp lưu giữ, vận chuyển và xử lý đối với từng loại chất thải lây nhiễm.

Việc đảm bảo ATSH đối với các PXN thuộc Trung tâm Y tế dự phòng tuyến tỉnh cũng được quy định trong Chuẩn Quốc gia TTYTDP tuyến tỉnh/thành phố (ban hành kèm theo Quyết định số 4696/QĐ-BYT ngày 27 tháng 11 năm 2008 của Bộ trưởng Bộ Y tế).

6. CÁC YÊU CẦU VỀ AN TOÀN SINH HỌC CỦA PXN

Để đảm bảo ATSH, PXN cần đáp ứng các yêu cầu về cơ sở vật chất; trang thiết bị; nhân sự; thực hành; phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố ATSH. Các yêu cầu này sẽ được đề cập chi tiết trong bài 4 “Các yêu cầu đối với PXN an toàn sinh học cấp I, cấp II”.

Theo quy định, các PXN chỉ được thực hiện hoạt động xét nghiệm khi có giấy chứng nhận an toàn sinh học phù hợp. Để được cấp giấy chứng nhận ATSH, đơn vị có PXN cần thực hiện các hoạt động sau:

- Phổ biến các quy định về ATSH cho tất cả nhân viên PXN;
- Cử người tham dự khóa đào tạo về ATSH do đơn vị có thẩm quyền tổ chức;
- Đánh giá thực trạng, lập kế hoạch và triển khai các hoạt động về ATSH của PXN về cơ sở chất; trang thiết bị; nhân sự; thực hành; phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố ATSH;
- Tự đánh giá việc đảm bảo ATSH của PXN theo bảng kiểm;
- Khi đã đáp ứng đầy đủ các yêu cầu, chuẩn bị và nộp hồ sơ xin cấp giấy chứng nhận cho cơ quan có thẩm quyền cấp (đối với PXN ATSH cấp II, giấy chứng nhận ATSH do Sở Y tế cấp).

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

1. Phòng ngừa phát tán TNGB có chủ ý từ PXN ra cộng đồng là hoạt động liên quan đến (lựa chọn đáp án đúng nhất):

- A. An toàn sinh học
- ☒ B. An ninh sinh học
- C. Vận chuyển TNGB
- D. Cả A, B, C đều đúng

2. Phòng ngừa phát tán TNGB không có chủ ý từ PXN ra cộng đồng là hoạt động liên quan đến (lựa chọn đáp án đúng nhất):

- ☒ A. An toàn sinh học
- B. An ninh sinh học
- C. Vận chuyển TNGB
- D. Cả A, B, C đều đúng

3. Không báo cáo việc bị đánh cắp các mẫu bệnh phẩm là vấn đề liên quan đến (lựa chọn đáp án đúng nhất):

- A. An toàn sinh học
- ☒ B. An ninh sinh học
- C. Vận chuyển TNGB
- D. Cả A, B, C đều đúng

4. Lựa chọn nhóm nguy cơ phù hợp của các VSV dưới đây (đánh dấu $\checkmark$ vào ô thích hợp):

STT	Tác nhân gây bệnh	Nhóm nguy cơ			
		1	2	3	4
1	Virus cúm A/H5N1			$\checkmark$	
2	Virus viêm gan B		$\checkmark$		
3	Virus HIV			$\checkmark$	
4	Vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i>	$\checkmark$			
5	Vi khuẩn tả		$\checkmark$		

5. Các nhóm yếu tố chính để đảm bảo ATSH bao gồm (lựa chọn đáp án đúng nhất):

☒ A. Cơ sở vật chất; trang thiết bị; nhân sự; thực hành; phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố.

B. Cơ sở vật chất; nhân sự; đào tạo; thực hành; xử lý chất thải.

C. Cơ sở vật chất; trang thiết bị; nhân sự; thực hành; xử lý chất thải.

☐ D. Cơ sở vật chất; trang thiết bị; nhân sự; đào tạo; phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố.

6. Hàng rào bảo vệ thứ nhất là (có thể lựa chọn nhiều đáp án):

A. Phòng xét nghiệm

☒ B. Tủ ATSH

☒ C. Trang bị bảo hộ cá nhân

D. Hệ thống thông khí

7. Hàng rào bảo vệ thứ hai là (có thể lựa chọn nhiều đáp án):

☒ A. Phòng xét nghiệm

B. Tủ ATSH

C. Trang bị bảo hộ cá nhân

☒ D. Hệ thống thông khí

CÁC YÊU CẦU ĐỐI VỚI PHÒNG XÉT NGHIỆM AN TOÀN SINH HỌC CẤP I, CẤP II THEO QUY ĐỊNH CỦA BỘ Y TẾ

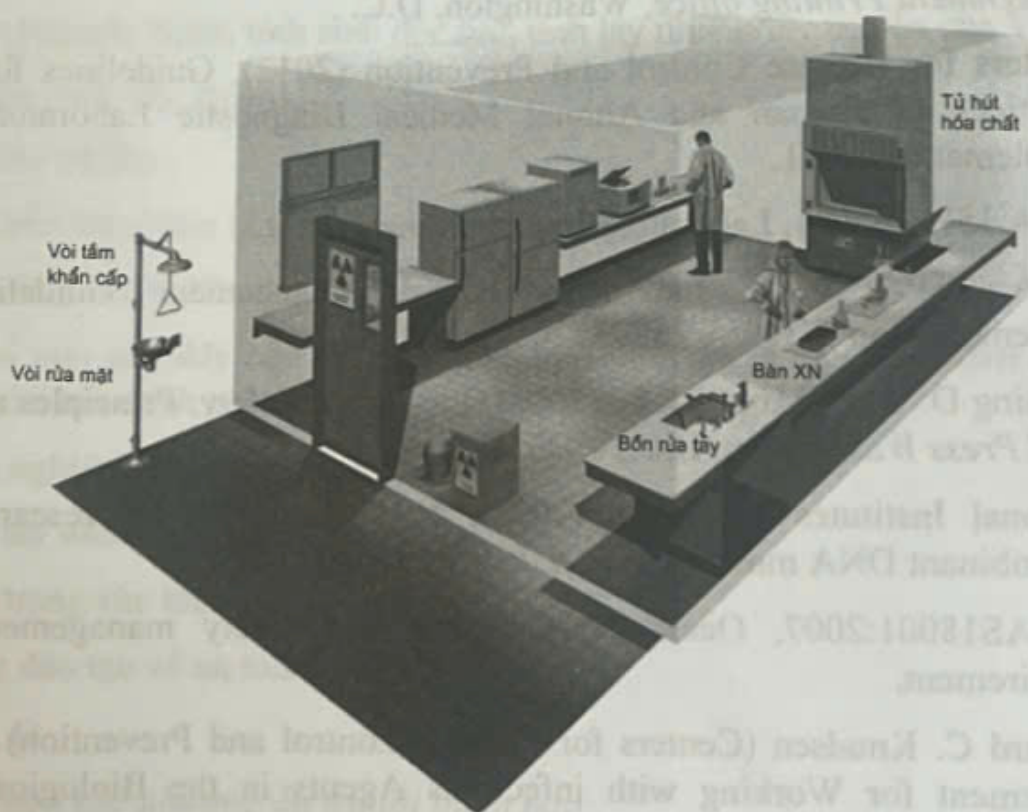
MỤC TIÊU HỌC TẬP

Sau bài này, học viên có khả năng:

1. Xác định được các yêu cầu về cơ sở vật chất và trang thiết bị, nhân sự, thực hành, giám sát y tế, phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố trong PXN ATSH cấp I, cấp II.
2. Đánh giá được việc đảm bảo ATSH đối với PXN an toàn sinh học cấp II theo bảng kiểm.

1. PHÒNG XÉT NGHIỆM AN TOÀN SINH HỌC CẤP I

Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp I được sử dụng để làm việc với các TNGB thuộc nhóm nguy cơ 1 và các sản phẩm từ VSV thuộc nhóm khác nhưng đã được xử lý và không còn khả năng gây bệnh như VSV sau khi đã được bất hoạt hoặc ADN, ARN tách chiết từ VSV...



Hình 2. Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp I điển hình (theo CUH2A, Princeton, NJ, Mỹ)

Các yêu cầu đối với PXN ATSH cấp I là các yêu cầu tối thiểu cho các PXN VSV ở tất cả các cấp độ ATSH. Các yêu cầu về cơ sở vật chất, trang thiết bị, nhân sự, thực hành, phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố ATSH đối với PXN ATSH cấp I đã được quy định cụ thể trong Nghị định số 92/2010/NĐ-CP của Chính phủ và Thông tư số 25/2012/TT-BYT của Bộ Y tế ban hành Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về thực hành và ATSH tại PXN.

1.1. Cơ sở vật chất

a. Có diện tích tối thiểu là $12m^2$ (không bao gồm diện tích để thực hiện các công việc hành chính liên quan đến xét nghiệm)

b. Yêu cầu kỹ thuật đối với cửa đi, cửa sổ

- Cửa đi: có khuôn, chốt, khóa an toàn; cánh cửa bằng gỗ hoặc vật liệu tổng hợp hoặc kim loại kết hợp với kính trong;

- Cửa sổ: có khuôn, chốt an toàn; cánh cửa bằng gỗ hoặc vật liệu tổng hợp hoặc kim loại kết hợp với kính trong hoặc mờ để chiếu sáng tự nhiên.

c. Yêu cầu kỹ thuật đối với sàn, tường và trần của PXN

- Sàn:

+ Không chênh cốt, không có gờ cửa đảm bảo phẳng, nhẵn, không trơn trượt, chịu được hóa chất, chống thấm và dễ cọ rửa vệ sinh;

+ Sàn bên trong các phòng rửa tiệt trùng, chuẩn bị môi trường chuẩn bị mẫu phải có chỗ thu nước khi cọ rửa;

+ Giao tuyến của sàn với tường đảm bảo dễ vệ sinh, chống đọng.

- Tường: bằng phẳng, dễ lau chùi, không thấm nước và chống được các loại hóa chất thường dùng trong PXN.

- Trần: phẳng, nhẵn, chống thấm và lắp đặt được các thiết bị (chiếu sáng, phòng cháy chữa cháy, điều hòa không khí hoặc thiết bị khác).

d. Mặt bàn xét nghiệm: không thấm nước, chịu được các dung dịch chất khử trùng, acid, kiềm, dung môi hữu cơ và chịu nhiệt.

e. Chỗ để quần áo và đồ dùng cá nhân cho nhân viên PXN ở bên ngoài và chỗ treo áo choàng PXN ở bên trong, gần cửa ra vào PXN.

f. Phòng xét nghiệm phải đảm bảo ánh sáng đủ cho các hoạt động: ánh sáng trong khu vực phòng thí nghiệm có độ rọi tối thiểu là 400 lux; khu vực rửa, tiệt trùng, chuẩn bị mẫu, môi trường, tắm, thay đồ là 250 lux, khu vực hành chính và phụ trợ là 140 lux.

g. Có bồn nước rửa tay. Bồn nước rửa tay nên lắp đặt gần cửa ra, vào. Nên trang bị khăn giấy sử dụng 1 lần để lau tay sau mỗi lần rửa tay.

h. Có thiết bị rửa mắt khẩn cấp và hộp sơ cứu tại vị trí thuận lợi cho việc sử dụng.

i. Có hệ thống điện đảm bảo an toàn theo tiêu chuẩn Quốc gia.

- Có nguồn điện thay thế;
 - Hệ thống dây dẫn và thiết bị kiểm soát, cung cấp điện phải đảm bảo an toàn và phù hợp các thông số kỹ thuật (công suất, chất lượng...);
 - Có hệ thống bảo vệ quá tải;
 - Tiếp đất toàn bộ hệ thống;
 - Ô cắm điện phải cao hơn nền PXN ít nhất 40 cm, không gần vòi nước;
- j. Khu vực có tia cực tím, tia laze, chất phóng xạ, chất độc phải có các biển báo tương ứng.
- k. Có các thiết bị phòng cháy, chữa cháy theo quy định.

1.2. Trang thiết bị

- a. Các thiết bị xét nghiệm phù hợp với kỹ thuật và loại VSV được xét nghiệm.
- b. Các thiết bị phải có nhãn đủ thông tin phù hợp như: tên, số seri, ngày đưa vào sử dụng, cảnh báo, tình trạng kiểm tra, hiệu chuẩn; lý lịch thiết bị và hướng dẫn sử dụng.
- c. Khi vận hành, các thiết bị phải đảm bảo các thông số kỹ thuật do nhà sản xuất đưa ra.
- d. Có các dụng cụ chứa chất thải đáp ứng tiêu chuẩn quy định đối với từng loại chất thải (theo Quyết định số 43/2007/QĐ-BYT ban hành ngày 30 tháng 11 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế).
- e. Có thiết bị để khử trùng dụng cụ và bệnh phẩm.
- f. Các trang bị bảo hộ cá nhân phù hợp với các kỹ thuật xét nghiệm thực hiện trong PXN ATSH cấp I.
- g. Trong trường hợp PXN có sử dụng các loại hóa chất độc hại, dễ bay hơi thì nên trang bị thêm tủ hút hóa chất cho PXN.

1.3. Nhân sự

- a. Có ít nhất 02 nhân viên PXN.
- b. Trước và trong quá trình làm việc tại PXN nhân viên phải được khám và theo dõi sức khỏe theo quy định tại Thông tư số 19/2011/TT-BYT ngày 06/6/2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế về hướng dẫn quản lý vệ sinh lao động sức khỏe người lao động và bệnh nghề nghiệp.
- c. Được đào tạo về ATSH PXN an toàn sinh học cấp I trở lên do các cơ sở trong nước được chỉ định hoặc nước ngoài cấp.
- d. Được đào tạo, tập huấn về an toàn lao động, phòng cháy và chữa cháy.
- e. Nhân viên PXN phải được đào tạo về chuyên ngành phù hợp hoặc có chứng chỉ được đào tạo về kỹ thuật xét nghiệm được thực hiện tại PXN.
- f. Nhân viên PXN phải được đào tạo lại hàng năm theo Thông tư số 22/2013/TT-BYT ngày 09 tháng 8 năm 2013 của Bộ Y tế về hướng dẫn công tác đào tạo liên tục đối với cán bộ y tế.

1.4. Quy định về thực hành

1.4.1. Quy định ra vào phòng xét nghiệm

Chỉ những người có trách nhiệm mới được phép vào PXN.

1.4.2. Quy định về thực hành an toàn trong phòng xét nghiệm

- a. Có và tuân thủ các quy trình xét nghiệm, hướng dẫn sử dụng trang thiết bị và quy trình xử lý chất thải;
- b. Không hút pipet bằng miệng;
- c. Không dùng bơm, kim tiêm để thay thế pipet hoặc vào bất kỳ mục đích khác ngoài mục đích tiêm, truyền hay hút dịch từ động vật thí nghiệm; bơm kim tiêm sau khi sử dụng phải được cho vào hộp đựng vật sắc nhọn chuyên biệt, không uốn cong, bẻ gãy, đập lại nắp kim tiêm hoặc tháo kim tiêm ra khỏi bơm tiêm;
- d. Rửa sạch vùng da tiếp xúc với các chất hóa học, rửa tay trước khi rời PXN;
- e. Mặc áo bảo hộ PXN, đi giày, dép kín mũi chân khi làm việc trong PXN, không mặc quần áo bảo hộ PXN ra khu vực công cộng;
- f. Không để chung quần áo bảo hộ PXN với quần áo thông thường;
- g. Không mang đồ dùng cá nhân, thực phẩm vào PXN;
- h. Không sử dụng thiết bị PXN để cất trữ hoặc chế biến thực phẩm;
- i. Không ăn uống, hút thuốc, cạo râu và sử dụng mỹ phẩm trong PXN.

1.4.3. Khử nhiễm và xử lý chất thải

- a. Phải khử nhiễm bề mặt bàn làm việc ngay sau khi kết thúc xét nghiệm, vào cuối ngày làm việc và khi có sự cố tràn, đổ mẫu bệnh phẩm chứa TNGB.
- b. Phân loại, vận chuyển và xử lý chất thải theo Quyết định số 43/2007/QĐ-BYT của Bộ Y tế về việc ban hành quy chế quản lý chất thải y tế và các quy định hiện hành.

1.5. Phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố an toàn sinh học

1.5.1. Cơ sở có PXN ATSH có trách nhiệm

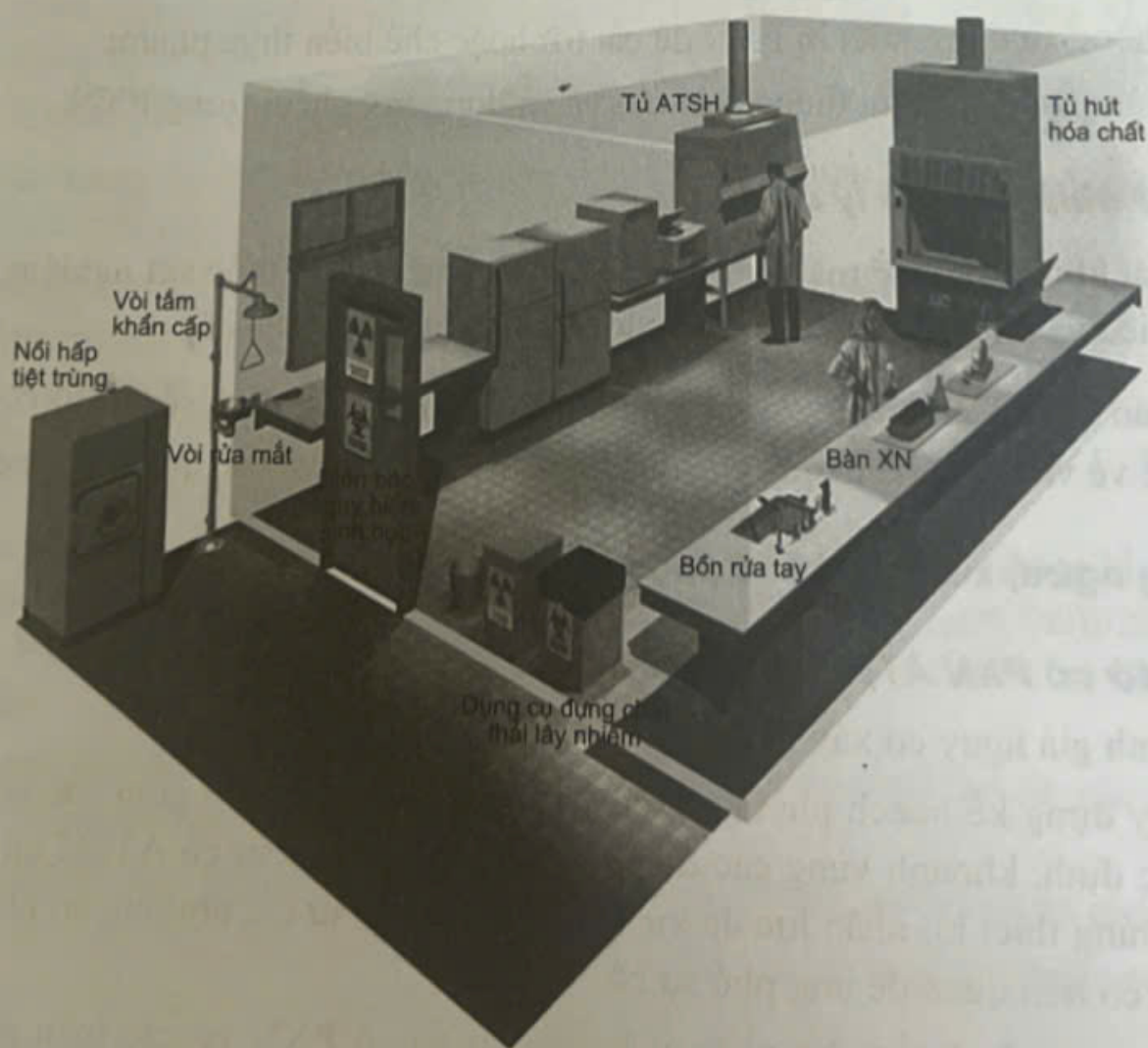
- Đánh giá nguy cơ xảy ra sự cố ATSH tại PXN;
- Xây dựng kế hoạch phòng ngừa, xử lý sự cố ATSH bao gồm các nội dung cơ bản sau: xác định, khoanh vùng các điểm có nguy cơ xảy ra sự cố ATSH tại PXN; các biện pháp, trang thiết bị, nhân lực để xử lý và khắc phục sự cố; phương án phối hợp với các cơ quan có liên quan để ứng phó sự cố ATSH;
- Đào tạo, tập huấn cho nhân viên của cơ sở có PXN về các biện pháp phòng ngừa và khắc phục sự cố ATSH;
- Phải có các quy trình xử lý sự cố.

1.5.2. Khi xảy ra sự cố ATSH, cơ sở có PXN có trách nhiệm

- Khẩn trương huy động nhân lực, trang thiết bị để xử lý sự cố theo kế hoạch phòng ngừa, xử lý sự cố ATSH và quy trình xử lý sự cố;
- Đối với sự cố ATSH ở mức độ ít nghiêm trọng, cơ sở có PXN phải tiến hành lập biên bản về xử lý, khắc phục sự cố và lưu hồ sơ này ít nhất 3 năm tại đơn vị;
- Đối với sự cố ATSH ở mức độ nghiêm trọng, cơ sở có PXN phải báo cáo sự cố và các biện pháp đã áp dụng để xử lý, khắc phục sự cố ATSH với Sở Y tế;
- Sau khi đã xử lý và khắc phục hậu quả sự cố ATSH, cơ sở có PXN phải tiến hành kiểm điểm, phân tích nguyên nhân xảy ra sự cố và sửa đổi, bổ sung kế hoạch phòng ngừa, xử lý sự cố ATSH.

2. PHÒNG XÉT NGHIỆM AN TOÀN SINH HỌC CẤP II

Phòng xét nghiệm ATSH cấp II thường được sử dụng để nghiên cứu, chẩn đoán, xét nghiệm các TNGB thuộc nhóm nguy cơ 2 và các xét nghiệm sử dụng trong PXN ATSH cấp I. Ngoài ra, PXN ATSH cấp II cũng được sử dụng để tiến hành một số xét nghiệm với TNGB thuộc nhóm nguy cơ 3. Thông tư số 07/2012/TT-BYT quy định chi tiết danh mục VSV và các kỹ thuật xét nghiệm được tiến hành trong PXN ATSH cấp II. Các yêu cầu được quy định cụ thể trong Nghị định số 92/2010/NĐ-CP của Chính phủ và Thông tư số 25/2012/TT-BYT của Bộ Y tế.



Hình 3. Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp II
(theo CUH2A, Princeton, NJ, Mỹ)

2.1. Cơ sở vật chất

- a. Cơ sở vật chất của PXN ATSH cấp II phải đáp ứng đầy đủ các quy định về cơ sở vật chất của PXN ATSH cấp I.
- b. Có diện tích tối thiểu là $20m^2$ (không bao gồm diện tích để thực hiện các công việc hành chính liên quan đến xét nghiệm).
- c. Có hệ thống xử lý chất thải lỏng. Nước thải đạt QCVN 28:2010/BTNMT của Bộ Tài nguyên Môi trường về nước thải y tế trước khi thải vào hệ thống thoát nước chung.
- d. Phải riêng biệt (có tường ngăn) với các PXN khác của cơ sở xét nghiệm.
- e. Có biển báo nguy hiểm sinh học dán trên các cửa ra vào của PXN.
- f. PXN ATSH cấp II nên có hệ thống thông khí.

2.2. Trang thiết bị

- a. Phòng xét nghiệm ATSH cấp II phải đáp ứng đầy đủ các quy định về trang thiết bị của PXN ATSH cấp I.
- b. Có tủ an toàn sinh học.
- c. Nồi hấp ướt tiệt trùng phải được đặt trong khu vực PXN. Tuy nhiên, chất thải lây nhiễm phát sinh từ các PXN có thể được thu gom và vận chuyển theo quy định đến khu vực chung, có nồi hấp tiệt trùng để xử lý.
- d. Các thiết bị PXN (tủ ATSH, nồi hấp tiệt trùng...) phải được kiểm tra bằng các phương pháp thích hợp trước khi đưa vào sử dụng. Sau đó việc kiểm tra và cấp lại kết quả kiểm chuẩn phải do cơ quan có thẩm quyền thực hiện ít nhất 1 năm 1 lần hoặc theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- e. Các trang thiết bị bảo hộ cá nhân phù hợp với loại kỹ thuật xét nghiệm thực hiện trong PXN ATSH cấp II.

2.3. Nhân sự

- a. Phòng xét nghiệm ATSH cấp II phải đáp ứng đầy đủ các quy định về nhân sự của PXN ATSH cấp I.
- b. Phải có ít nhất 02 nhân viên.
- c. Cơ sở có PXN phải phân công người phụ trách về ATSH.
- d. Nhân viên PXN phải được tiêm chủng hoặc sử dụng thuốc phòng bệnh liên quan đến các TNGB khi thực hiện xét nghiệm.
- e. Nhân viên phải có giấy xác nhận đã qua tập huấn về ATSH PXN an toàn sinh học cấp II trở lên do các cơ sở trong nước được chỉ định hoặc nước ngoài cấp (danh sách các cơ sở được ban hành kèm theo).

f. Nhân viên PXN mang thai, mắc bệnh truyền nhiễm hoặc bị suy giảm miễn dịch phải thông báo cho người phụ trách PXN để được phân công công việc giảm nguy cơ bị lây nhiễm với TNGB.

2.4. Quy định về thực hành

a. Phòng xét nghiệm ATSH cấp II phải đáp ứng đầy đủ các quy định về thực hành của PXN ATSH cấp I.

b. Sử dụng tủ ATSH cho các thao tác xét nghiệm có tạo ra khí dung có khả năng gây bệnh.

c. Sử dụng găng tay trong tất cả quá trình tiếp xúc trực tiếp hoặc có nguy cơ tiếp xúc với các chất lây nhiễm. Sau khi sử dụng, tháo bỏ găng tay đúng cách và phải rửa tay.

d. Người phụ trách ATSH và nhân viên PXN phải thực hiện đánh giá nguy cơ để áp dụng các biện pháp đảm bảo ATSH phù hợp.

e. Có quy trình lưu giữ bảo quản TNGB truyền nhiễm tại PXN.

2.5. Phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố

a. Phòng xét nghiệm ATSH cấp II phải đáp ứng đầy đủ các quy định về phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố an của PXN ATSH cấp I.

b. Phải có các quy trình xử lý sự cố liên quan đến TNGB truyền nhiễm sử dụng trong PXN như: sự cố tràn đổ mẫu bệnh phẩm chứa TNGB trong và ngoài tủ ATSH; vật sắc nhọn đâm vào tay, chân; cháy nổ; tràn đổ hóa chất, nuốt phải vật liệu nhiễm trùng, vỡ ống chứa vật liệu nhiễm trùng trong máy ly tâm...

3. THỰC HÀNH

Sử dụng Bảng kiểm ATSH cho PXN ATSH cấp II (phụ lục 1) để đánh giá việc đảm bảo ATSH PXN tại cơ sở thông qua quan sát, phỏng vấn, kiểm tra.

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

1. Lựa chọn các yêu cầu về cơ sở vật chất, trang thiết bị đối với PXN ATSH cấp I (có thể lựa chọn nhiều đáp án):

A. PXN phải riêng biệt với các PXN khác của cơ sở

☒ B. Các cửa sổ và cửa ra vào PXN phải có chốt và khóa an toàn

☒ C. Có thiết bị rửa mắt khẩn cấp và hộp sơ cứu tại vị trí thuận lợi cho việc sử dụng

☒ D. Có chỗ treo áo choàng PXN ở bên trong, gần cửa ra vào PXN

E. Có tủ an toàn sinh học

2. Lựa chọn phương án trả lời thích hợp:

2.1. Các PXN ATSH cấp I cần có lưu thông không khí định hướng

A. Đúng

☒ B. Sai

2.2. PXN ATSH cấp I phải có các dụng cụ chứa chất thải đáp ứng tiêu chuẩn quy định đối với từng loại chất thải phát sinh trong PXN:

☒ A. Đúng

B. Sai

2.3. Phòng xét nghiệm ATSH cấp I có thể sử dụng ổ cắm điện rời, đặt dưới sàn nhà:

A. Đúng

☒ B. Sai

2.4. Khu vực có tia cực tím, tia laze, chất phóng xạ, chất độc phải có các biển báo tương ứng:

☒ A. Đúng

B. Sai

2.5. PXN ATSH cấp I phải có biển báo nguy hiểm sinh học dán trên các cửa ra vào của PXN:

A. Đúng

☒ B. Sai

3. Đối tượng nào được phép vào khu vực làm xét nghiệm của PXN ATSH cấp I (lựa chọn đáp án đúng nhất)?

☒ A. Cán bộ xét nghiệm

B. Trẻ em

C. Bệnh nhân

D. Cả 3 đối tượng trên

4. Thao tác nào sau đây không được làm trong PXN ATSH (có thể lựa chọn nhiều đáp án)?

A. Mặc áo choàng, đi giày/dép kín mũi chân trong PXN.

☒ B. Mặc quần áo bảo hộ PXN ra khu vực công cộng.

☒ C. Hút pipet bằng miệng.

☒ D. Sử dụng bơm, kim tiêm để thay thế pipet.

☒ E. Ăn uống trong PXN.

5. Bơm, kim tiêm sau khi sử dụng xử lý như thế nào (lựa chọn đáp án đúng nhất)?

A. Đẩy lại nắp kim tiêm và cho vào túi đựng rác thải lây nhiễm.

☒ B. Đẩy lại nắp kim tiêm và cho vào hộp đựng vật sắc nhọn chuyên biệt.

C. Tháo kim tiêm ra khỏi bơm tiêm và cho kim tiêm vào hộp đựng vật sắc nhọn chuyên biệt.

☒ D. Cho ngay vào hộp đựng vật sắc nhọn chuyên biệt.

6. Nhân viên PXN phải rửa tay bằng xà phòng khi nào (có thể lựa chọn nhiều đáp án)?

A. Trước khi vào PXN

☒ B. Sau khi làm việc với vật liệu lây nhiễm

☒ C. Ngay sau khi tháo găng tay

☒ D. Trước khi rời khỏi PXN

7. Nhân viên PXN phải khử nhiễm bề mặt bàn làm xét nghiệm như thế nào (có thể lựa chọn nhiều đáp án)?

A. Không cần khử nhiễm bề mặt bàn làm xét nghiệm

☒ B. Ngay sau khi kết thúc xét nghiệm

C. 1 lần/tuần

☒ D. Khi có sự cố tràn, đổ mẫu bệnh phẩm chứa TNGB

8. Các yêu cầu về giám sát y tế đối với PXN ATSH cấp I bao gồm (lựa chọn đáp án đúng nhất):

A. Nhân viên PXN cần phải kiểm tra sức khỏe trước khi tuyển dụng.

B. Nhân viên PXN cần phải kiểm tra sức khỏe định kỳ hàng năm.

C. Hồ sơ sức khỏe của nhân viên PXN được lưu tại cơ sở có PXN.

☒ D. Cả A, B, C đều đúng.

9. Lựa chọn các yêu cầu về cơ sở vật chất, trang thiết bị đối với PXN ATSH cấp II (có thể lựa chọn nhiều đáp án):

A. Có phòng đệm trước khi vào phòng thực hiện xét nghiệm.

☒ B. Có hệ thống xử lý nước thải đạt quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về môi trường trước khi thải vào nơi chứa nước thải chung.

☒ C. Có biển báo nguy hiểm sinh học dán trên các cửa ra vào của PXN.

D. PXN phải duy trì áp suất âm hơn so với bên ngoài.

☒ E. Các thiết bị (tủ ATSH, nồi hấp tiệt trùng...) trong PXN ATSH cấp II phải được kiểm tra trước khi đưa vào sử dụng.

10. Lựa chọn phương án trả lời thích hợp.

10.1. PXN ATSH cấp II phải có hệ thống thông khí tự nhiên hay cơ học:

☒ A. Đúng

☒ B. Sai

10.2. PXN ATSH cấp II phải riêng biệt với các PXN khác của cơ sở xét nghiệm:

☒ A. Đúng

B. Sai

10.3. PXN ATSH cấp II phải có nồi hấp tiệt trùng đặt trong khu vực PXN:

☒ A. Đúng

B. Sai

10.4. PXN ATSH cấp II phải có tủ ATSH:

- ☒ A. Đúng
☐ B. Sai

10.5. Cơ sở có PXN ATSH cấp II phải phân công người phụ trách về ATSH:

- ☒ A. Đúng
☐ B. Sai

11. Những thao tác nào không được làm trong PXN ATSH cấp II (có thể lựa chọn nhiều đáp án)?

- ☒ A. Tiến hành thao tác xét nghiệm có nguy cơ tạo ra khí dung có khả năng gây bệnh ở bàn làm việc thông thường.
☐ B. Tiếp xúc tay với các chất lây nhiễm hoặc bề mặt có khả năng lây nhiễm.
☐ C. Rửa tay ngay sau khi tháo găng tay.
☐ D. Tất cả A, B, C đều đúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2007), Quyết định số 43/2007/QĐ-BYT về việc ban hành Quy chế quản lý chất thải Y tế.
2. Bộ Y tế (2008), Thông tư số 07/2008/TT-BYT về hướng dẫn công tác đào tạo liên tục đối với cán bộ y tế.
3. Bộ Y tế (2011), Thông tư số 19/2011/TT-BYT về hướng dẫn quản lý vệ sinh lao động sức khỏe người lao động và bệnh nghề nghiệp.
4. Bộ Y tế (2012), Thông tư số 07/2012/TT-BYT quy định Danh mục vi sinh vật gây bệnh truyền nhiễm theo nhóm nguy cơ và cấp độ ATSH phù hợp kỹ thuật xét nghiệm.
5. Bộ Y tế (2012), Thông tư số 25/2012/TT-BYT ban hành Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về thực hành và ATSH tại PXN.
6. Bộ Y tế (2012), Thông tư số 29/2012/TT-BYT quy định thủ tục cấp mới, cấp lại giấy chứng nhận phòng xét nghiệm đạt tiêu chuẩn ATSH.
7. Chính phủ (2010), Nghị định số 92/2010/NĐ-CP Quy định chi tiết thi hành Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm về bảo đảm ATSH tại phòng xét nghiệm.
8. WHO (2004), Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition.

Chương 10

PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM MIỄN DỊCH

1. TỔNG QUAN

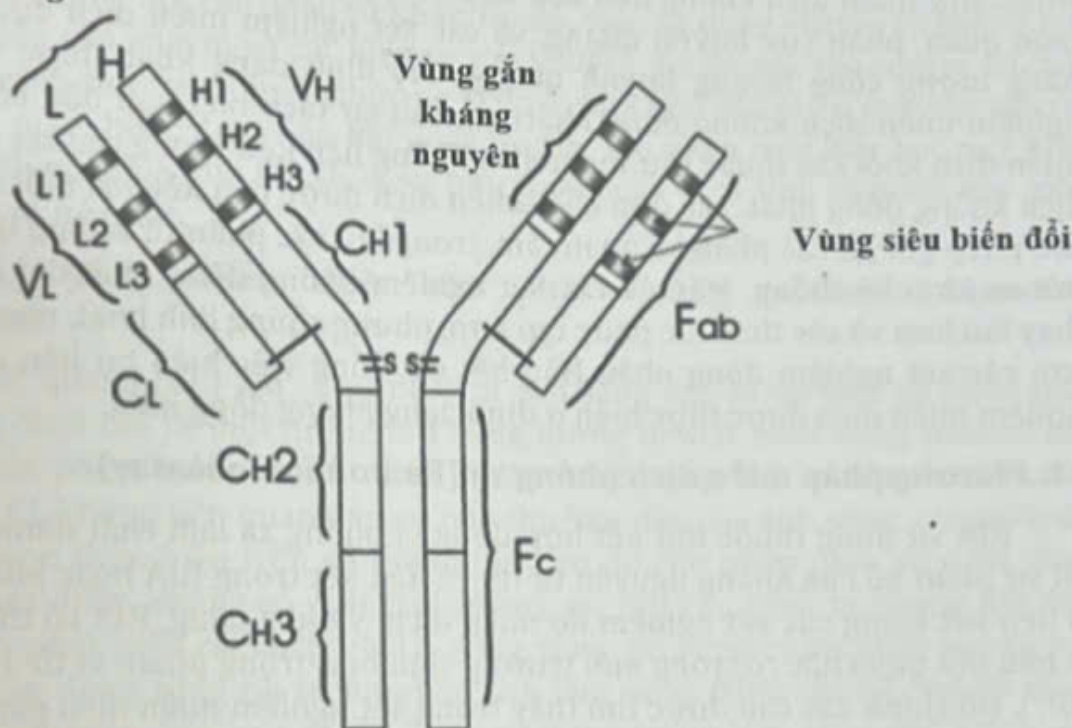
Xét nghiệm miễn dịch, dựa trên liên kết ái lực giữa kháng thể và kháng nguyên tương ứng, là công nghệ phân tích phát triển nhanh nhất để phát hiện và định lượng các phân tử sinh học trong chẩn đoán lâm sàng. Bản chất liên kết chọn lọc của kháng thể cho phép phát hiện cụ thể các phân tử mục tiêu ngay cả với nồng độ rất thấp và chất nền sinh học phức tạp, chẳng hạn như trong mẫu máu toàn phần, huyết thanh và các dịch sinh học khác. Ngoài ra, một loạt các kháng thể có thể được tạo ra trong tự nhiên và sự sẵn có của nhiều nhãn gắn có thể phát hiện cho phép xét nghiệm miễn dịch phát hiện nhiều loại chất phân tích với giới hạn phát hiện thấp (LOD-Limit of detection). Cảm biến miễn dịch là sự kết hợp của xét nghiệm miễn dịch và đầu dò tín hiệu liên kết trực tiếp. Kết hợp độ đặc hiệu cao của phản ứng miễn dịch với độ nhạy và lợi thế của các kỹ thuật phát hiện, cảm biến miễn dịch hiện được coi là một bước phát triển lớn trong lĩnh vực hóa miễn dịch. So với các phương pháp xét nghiệm miễn dịch truyền thống, cảm biến miễn dịch đơn giản và thuận tiện, có thể thực hiện phát hiện tại chỗ, thời gian thực và tự động. Hơn nữa, với sự xuất hiện của công nghệ nano, những chân trời mới cho sự phát triển của các cảm biến miễn dịch siêu nhạy và siêu trường thành đang xuất hiện. Những đặc điểm này có thể đáp ứng các yêu cầu của xét nghiệm tại điểm chăm sóc và mang lại các xét nghiệm chẩn đoán phân tử cho các hệ thống chăm sóc sức khỏe cộng đồng và các quần thể chưa được phục vụ. Trong chương này, chúng tôi giới thiệu ngắn gọn nguyên tắc chính của xét nghiệm miễn dịch trong chẩn đoán tiêu chuẩn. Giới thiệu về một số kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch thường được sử dụng trên lâm sàng, để cung cấp những kiến thức cơ bản và phần nào đó ứng dụng trực tiếp vào những công việc về sau.

2. KHÁNG NGUYÊN, KHÁNG THỂ VÀ NGUYÊN LÝ PHẢN ỨNG MIỄN DỊCH

Xét nghiệm miễn dịch sử dụng kháng thể (kháng nguyên) hoặc thuốc thử liên quan đến kháng thể để xác định chất phân tích mẫu bằng các phản ứng miễn dịch cụ thể giữa kháng thể và kháng nguyên. Kháng thể thường được tạo ra trong cơ thể nhờ khả năng tạo ra hiệu ứng sinh học của sinh vật, gọi là phản ứng miễn dịch. Khi một chất lạ xâm nhập vào cơ thể của một động vật cao cấp, phản ứng miễn dịch dẫn đến việc tổng hợp một loại protein nhất định để xác định tác nhân xâm nhập và ngăn chặn tác hại của nó. Protein này được định nghĩa là kháng thể đối với chất lạ. Kháng thể cho thấy độ đặc hiệu rất cao và hằng số liên kết đối với kháng nguyên tương ứng của nó. Kháng nguyên đã được định nghĩa là "bất kỳ tác nhân nào làm phát sinh sự hình thành kháng thể đặc hiệu cho tác nhân này khi được chuyển vào hệ thống tế bào sống có chứa các tế bào thuộc loại có thẩm quyền về mặt miễn dịch." Các kháng nguyên tự nhiên có thể là các chất đại phân tử như protein và acid

nucleic. Các haptens được định nghĩa là một số chất có trọng lượng phân tử thấp hướng đến. Trái ngược với kháng nguyên, haptens không thể trực tiếp kích hoạt hệ thống miễn dịch của động vật để tạo ra kháng thể trừ khi chúng kết hợp với chất mang protein như albumin huyết thanh bò và ovalbumin. Các kháng thể được tổng hợp để phản ứng với sự hiện diện của một chất lạ. Có năm loại globulin miễn dịch khác nhau (G, A, M, D và E), khác nhau ở các vùng không đổi của chuỗi nặng cung cấp và thứ hai được tạo ra để phản ứng với một chất không phải là chính mình xâm nhập. IgA bảo vệ màng nhầy và IgE bảo vệ chống lại ký sinh trùng. Tuy nhiên, chức năng chính của IgD vẫn chưa được biết rõ. Trong số năm loại kháng thể, IgG là loại được sử dụng thường xuyên nhất để xét nghiệm miễn dịch vì nó tồn tại ở mức cao nhất và luôn sẵn có.

Miền tương đồng



Hình 10.1. Cấu trúc cơ bản của IgG

Nói chung, cấu trúc của IgG được biểu diễn bằng hình chữ Y bao gồm hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi chứa một số miền, được giữ với nhau bằng liên kết disulfide. Hai đoạn kết thúc kép của Y được ký hiệu là đoạn Fab và là vị trí tại đó kháng thể liên kết với kháng nguyên. Các vùng thay đổi và siêu biến của Fab tạo ra một phần hoạt động nhận biết một vùng cụ thể của kháng nguyên. Đoạn số ít ở đầu kia của hình dạng Y được gọi là đoạn Fc, không thể liên kết với kháng nguyên nhưng có khả năng bám vào bề mặt tế bào và đi qua nhau thai. Nguyên tắc của sự tương tác giữa kháng nguyên với kháng thể nằm trong sự kết hợp cụ thể của yếu tố quyết định kháng nguyên với đoạn Fab của kháng thể. Liên kết đặc hiệu giữa kháng

nguyên và kháng thể là tập hợp các lực không hóa trị bao gồm lực tĩnh điện, lực hút nước, liên kết hydro và tương tác Van der Waals. Tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể khá mạnh, được chỉ ra bởi hằng số liên kết lớn $10^5 - 10^{12}$ M. Do đó, phức hợp của kháng nguyên kháng thể không phân ly dễ dàng trừ khi một số dung dịch khắc nghiệt như dung dịch đệm ở pH cao hơn 10 hoặc thấp hơn 3, dung môi hữu cơ và dung dịch muối ở nồng độ cao được sử dụng để tạo ra quá trình phân ly.

3. PHÂN LOẠI XÉT NGHIỆM MIỄN DỊCH

Kể từ khi công cụ xét nghiệm miễn dịch được đề xuất vào năm 1959, khi Berson và Yalow lần đầu tiên mô tả phương pháp xét nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA-Radioimmunoassay) trong phân tích nồng độ insulin, xét nghiệm miễn dịch đã được điều chỉnh theo nhiều định dạng phù hợp với các ứng dụng và quy trình thử nghiệm cụ thể. Trong một số định dạng, được định nghĩa là xét nghiệm miễn dịch đồng nhất, các chiến lược xét nghiệm không yêu cầu tách các đơn vị miễn dịch khỏi thuốc thử miễn dịch không liên kết. Cách tiếp cận này bao gồm ngưng kết, điện di mao quản, phân cực huỳnh quang, và các xét nghiệm miễn dịch dựa trên truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang. Các định dạng khác được mô tả là xét nghiệm miễn dịch không đồng nhất yêu cầu sự tách biệt ban đầu của các đơn vị miễn dịch khỏi các thuốc thử miễn dịch không liên kết. Trong các xét nghiệm miễn dịch không đồng nhất, các đơn chất miễn dịch được liên kết với một chất nền rắn, cho phép giữ lại các phân tử quan tâm, trong khi các phân tử không liên kết bị rửa trôi ra khỏi hệ thống. Mặc dù các xét nghiệm không đồng nhất đòi hỏi thời gian chạy lâu hơn và các thao tác phức tạp hơn, nhưng chúng linh hoạt, nhạy và đặc hiệu hơn các xét nghiệm đồng nhất. Hầu hết các công việc hiện tại liên quan đến xét nghiệm miễn dịch được thực hiện ở định dạng không đồng nhất.

3.1. Phương pháp miễn dịch phóng xạ (Radioimmunoassay)

RIA sử dụng thuốc thử kết hợp đồng vị phóng xạ làm chất đánh dấu để theo dõi sự phân bố của kháng nguyên tự do và liên kết trong RIA hoặc kháng thể tự do và liên kết trong các xét nghiệm đo miễn dịch. Về khả năng, RIA có thể áp dụng để đo hầu hết mọi chất có trong môi trường sinh học, trong phạm vi từ 10^{-6} đến 10^{-14} mol/l. Độ chính xác cao được tìm thấy trong xét nghiệm miễn dịch gắn nhãn phóng xạ có liên quan đến nền phóng xạ không đáng kể trong các mẫu sinh học. Ngoài ra, quá trình phân rã của đồng vị phóng xạ không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường sinh học, chẳng hạn như độ pH, cường độ ion và chất ức chế có thể ảnh hưởng đến việc phát hiện trong các phương pháp đó phụ thuộc vào phép đo quang học hoặc hoạt động của enzym. Mặc dù RIA là đáng tin cậy và chính xác, nhưng nó có nguy cơ gây hại cho sức khỏe và thời gian bán hủy ngắn liên quan đến đồng vị phóng xạ, điều này hạn chế việc sử dụng công nghệ này.

3.2. Phương pháp miễn dịch huỳnh quang (Fluoroimmunoassay)

Phương pháp xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang (FIA) sử dụng nhãn huỳnh quang để phát hiện chất phân tích. Giới hạn phát hiện đối với phương pháp này có xu hướng cao do các vấn đề về huỳnh quang nền và dập tắt. Các vấn đề này hạn chế

độ nhạy của phương pháp sử dụng đầu dò huỳnh quang thông thường, đã được khắc phục bằng cách sử dụng huỳnh quang phân giải theo thời gian (Time-resolved fluoroimmunoassay-TRFIA) đã cho phép phát triển các xét nghiệm với giới hạn phát hiện thấp hơn nhiều. Nguyên tắc huỳnh quang phân giải theo thời gian tận dụng sự phân rã nhanh hơn của huỳnh quang nền sau khi được kích thích, và do đó phép đo được thực hiện sau khi huỳnh quang nền đã phân rã đến mức không đáng kể, trong khi huỳnh quang của đầu dò vẫn cao đáng kể.

3.3. Phương pháp hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA) là một trong những loại xét nghiệm miễn dịch được sử dụng rộng rãi nhất và an toàn hơn và dễ dàng hơn so với RIA. ELISA liên quan đến việc sử dụng hoạt tính của enzyme như một phương tiện phát hiện sự gắn kết của liên hợp kháng thể-enzyme. Các enzyme đặc hiệu trong cả phản ứng mà chúng xúc tác và cơ chất mà chúng nhận ra và chịu sự điều chỉnh hoạt động bởi các phân tử khác. Do đó, việc sử dụng enzyme có thể có lợi do tính đặc hiệu của enzyme và các hiện tượng khuếch đại do xúc tác enzyme. ELISA khác nhau ở hình thức phát hiện, thường là đo quang phổ khi nhãn enzyme tạo ra sản phẩm có màu, hoặc điện hóa khi enzyme xúc tác phản ứng hóa học oxy hóa khử. Nhược điểm chính của ELISA là sự phụ thuộc của hoạt tính enzyme vào môi trường vật lý và hóa học.

3.4. Phương pháp miễn dịch hóa phát quang (Chemiluminescent immunoassay)

Hóa phát quang (CL) mô tả sự phát ra ánh sáng xảy ra do một số phản ứng hóa học nhất định tạo ra một lượng lớn năng lượng bị mất dưới dạng photon khi các phân tử sản phẩm bị kích thích điện tử giãn ra về trạng thái cơ bản ổn định của chúng. Bởi vì CL không liên quan đến sự hấp thụ ban đầu của ánh sáng, các phép đo phát xạ CL được thực hiện trên nền thấp hơn, do đó cho phép phát hiện độ nhạy cao hơn. Do ưu điểm không có chất thải phóng xạ, yêu cầu thiết bị tương đối đơn giản, giới hạn phát hiện rất thấp và dải động rộng, phương pháp phát quang hóa học đã được áp dụng rộng rãi trong phân tích lâm sàng. Nhìn chung, hai kỹ thuật phân tích phát quang hóa học chính được sử dụng trong lâm sàng phân tích: (1) nhãn luminol hoặc acridinium ester, v.v. được sử dụng trong xét nghiệm miễn dịch phát quang hóa học (CLIA); (2) kỹ thuật phát hiện hóa chất phát quang bằng cách sử dụng horseradish peroxidase (HRP) hoặc phosphatase kiềm (ALP) làm nhãn cho xét nghiệm miễn dịch enzyme. Kỹ thuật đầu tiên phát hiện trực tiếp tia sáng của thuốc thử phát quang để xác định chất phân tích. Trong phương pháp thứ hai, cơ chất phát quang hóa học trải qua quá trình oxy hóa xúc tác peroxidase với sự có mặt của chất oxy hóa thích hợp, và giới hạn phát hiện đối với nhãn enzyme có thể giảm xuống phạm vi yếu tố bằng cách phát hiện hóa chất phát quang.

3.5. Phương pháp miễn dịch điện hóa phát quang (Electrochemiluminescence Immunoassay)

Xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA) là một phương pháp định lượng để đo kháng nguyên hoặc kháng thể dựa trên sự thay đổi tín hiệu điện hóa phát quang (ECL) trước và sau phản ứng miễn dịch. ECL là quá trình theo đó các sản phẩm được tạo ra tại điện cực trải qua phản ứng chuyển điện tử năng lượng cao để tạo thành các trạng thái kích thích phát ra ánh sáng. Tương tự như CL, ECL không yêu cầu sử dụng nguồn sáng bên ngoài. Mặc dù ECL là một dạng CL, nhưng nó có một số ưu điểm hơn CL. Đầu tiên, trong ECL, phản ứng điện hóa cho phép kiểm soát thời gian và vị trí của phản ứng phát sáng. Bằng cách kiểm soát thời gian, sự phát xạ ánh sáng có thể bị trì hoãn cho đến khi xảy ra các sự kiện như phản ứng miễn dịch hoặc phản ứng xúc tác bởi enzyme. Kiểm soát vị trí có thể được sử dụng để giới hạn phát xạ ánh sáng đến một khu vực được định vị chính xác đối với máy dò, cải thiện độ nhạy bằng cách tăng tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu. Ngoài ra, điều khiển vị trí phát xạ có thể được sử dụng để xác định kết quả của nhiều hơn một phản ứng phân tích trong cùng một mẫu bằng cách thăm vắn từng điện cực trong một mảng, theo trình tự hoặc đồng thời bằng cách sử dụng máy dò vị trí nhạy cảm. Thứ hai, ECL có thể chọn lọc hơn CL vì việc tạo ra các trạng thái kích thích trong ECL có thể được kiểm soát một cách chọn lọc bằng cách thay đổi các thế điện cực. Thứ ba, ECL có thể nhạy hơn CL vì một số chất phản ứng có thể được tái tạo điện hóa ở điện cực và dẫn đến quá trình khuếch đại chu kỳ oxy hóa khử. Thứ tư, tín hiệu dòng điện và tín hiệu ánh sáng được thu đồng thời, tạo điều kiện thuận lợi cho việc khảo sát cơ chế phát xạ ánh sáng bằng phương pháp điện hóa, khảo sát phản ứng điện hóa bằng ECL, cũng như phát hiện đồng thời ECL và điện hóa. Tuy nhiên, yêu cầu đối với các kỹ thuật điện hóa trong ECL, chẳng hạn như thiết lập điện hóa và làm mới bề mặt điện cực, dẫn đến một số hạn chế cho các ứng dụng phân tích.

A. PHƯƠNG PHÁP ELISA

MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên lý của các phương pháp ELISA.
2. Trình bày được các thành phần cấu tạo cơ bản của các hệ thống máy xét nghiệm ELISA.
3. Trình bày được các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm ELISA và các biện pháp khắc phục.

1. TỔNG QUAN VỀ PHƯƠNG PHÁP ELISA

1.1. Định nghĩa về phương pháp

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), còn được gọi là enzyme immunoassay (EIA), là một kỹ thuật sinh hóa sử dụng để phát hiện sự hiện diện

của một kháng thể hoặc kháng nguyên trong một mẫu. Theo thuật ngữ đơn giản, trong kỹ thuật ELISA, một lượng của kháng nguyên được gắn với một bề mặt, và sau đó là một kháng thể đặc hiệu được cho vào để nó có thể liên kết với các kháng nguyên. Kháng thể này sẽ liên kết với enzyme, và cuối cùng thêm cơ chất để enzyme phân giải cơ chất và phát ra những tín hiệu, phổ biến nhất là sự đổi màu một chất hóa học...

1.2. Lịch sử phát triển phương pháp

Tiền thân của ELISA là kỹ thuật miễn dịch học phóng xạ (Radioimmunoassay - RIA), được phát triển bởi Rosalyn Sussman Yalow và Solomon Aaron Berson (xuất bản lần đầu tiên năm 1960; Nobel y học cho Rosalyn S. Yalow năm 1977). Mặc dù phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao, tuy nhiên việc sử dụng phóng xạ cho việc phát hiện yêu cầu kỹ thuật cao, phức tạp, tốn kém, đặc biệt việc sử dụng phải vô cùng cẩn thận vì khả năng gây nguy hiểm của phóng xạ đã dẫn đến việc đặt ra yêu cầu tìm kiếm các phương pháp cải tiến thay thế. Để thay cho việc sử dụng chất đánh dấu phóng xạ, người ta đã sử dụng kỹ thuật liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể với một enzyme (enzyme-linked) có khả năng thực hiện một phản ứng nhận biết (ví dụ như gây đổi màu một chất).

Trong suốt quá trình phát triển của xét nghiệm miễn dịch, ý tưởng sử dụng enzyme gắn nhãn đã vấp phải nhiều sự hoài nghi. Người ta cho rằng các enzym quá lớn để các phân tử sinh học được sử dụng làm nhãn và sự hiện diện của chúng rất có thể sẽ gây ra cản trở không gian phản ứng. Những lo ngại như vậy đã được giải quyết bằng cách lập kế hoạch và thực hiện các thí nghiệm cẩn thận, chứng tỏ tính khả thi của các enzym gắn nhãn. Sự thành công của các xét nghiệm miễn dịch liên kết với enzym trong giai đoạn đầu đã chứng minh những người hoài nghi đã sai và mở đường cho sự tiến bộ hơn nữa của các xét nghiệm miễn dịch.

Giữa năm 1966 và 1969, Avrameas và cộng sự, đã báo cáo sự kết hợp kháng nguyên-kháng thể thành công bằng cách sử dụng các enzym như phosphatase kiềm, và glucose oxidase trong số các enzym khác. Avrameas và các đồng nghiệp đã tối ưu hóa quy trình gắn nhãn và quá trình ghép nối tiếp theo thông qua phân tử glutaraldehyde. Các phân tử sinh học được đánh dấu bằng enzym (kháng nguyên hoặc kháng thể) được sử dụng để phát hiện phân tử sinh học thông qua miễn dịch huỳnh quang. Xét nghiệm miễn dịch Enzyme (EIA) được phát triển tại Phòng thí nghiệm Nghiên cứu Organon ở Hà Lan bởi Anton Schuurs và Bauke van Weemen.

Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA) được lên ý tưởng tại Đại học Stockholm, Thụy Điển, bởi Peter Perlmann và Eva Engvall vào năm 1971. Thử nghiệm ELISA đầu tiên đã chứng minh phép đo định lượng kháng thể thô với enzyme gắn nhãn phosphatase kiềm. ELISA đã trở nên thành công hơn EIA ở khía cạnh thương mại hóa.

Tác động của EIA và ELISA đối với xét nghiệm miễn dịch chẩn đoán và hệ thống chăm sóc sức khỏe hầu như không vượt trội. Số lượng các cuộc điều tra phân tích và lâm sàng được thực hiện trên toàn thế giới dựa trên kiến thức về EIA và

ELISA là thiên văn và số lượng các phép đo sử dụng các xét nghiệm miễn dịch này để chăm sóc bệnh nhân thông thường là cực kỳ lớn. Trên thế giới hầu như không có phòng xét nghiệm chẩn đoán nào không gặp đĩa đệm ELISA.

1941- A.H.Coons và cộng sự lần đầu tiên gắn nhãn kháng thể bằng thuốc nhuộm huỳnh quang và sử dụng để xác định kháng nguyên trong các mô sinh thiết

1960- R.Sussman và S.Berson mô tả về RIA tuy nhiên đặt ra vấn đề về tính an toàn của phương pháp và giải pháp thay thế an toàn hơn

1971- E.Engvall và P.Oerlman độc lập phát minh ra ELISA sử dụng kháng thể để phát hiện ra sự hiện diện của virus, hormone

1976- Phương pháp ELISA cạnh tranh, trong đó cơ chất liên hợp cạnh tranh với protein quan tâm, được phát triển và sử dụng để phát hiện hormone choriogonadotropin của người

1977- Phương pháp ELISA Sandwich được phát triển và thử nghiệm trên một số chất nền để chứng minh khái niệm

1978- ELISA gián tiếp, trong đó một kháng thể thứ cấp được thêm vào cho mục đích phát hiện, được phát triển và sử dụng để phát hiện albumin huyết thanh người

1985- Xét nghiệm ELISA là phương pháp xét nghiệm sàng lọc đầu tiên được sử dụng đối với HIV. Nó được chấp thuận sử dụng vào ngày 2/3/1985.

Hình 10.2. Lược đồ lịch sử phát triển của phương pháp ELISA

1.3. Nguyên lý phương pháp

Phương pháp ELISA dựa trên cơ sở phản ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể tương tự như phản ứng miễn dịch xảy ra trong cơ thể-phản ứng đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể khỏi các tác nhân như mầm bệnh hay độc tố. Bằng cách khai thác phản ứng này, ELISA cho phép phân tích định lượng/định tính có độ nhạy cao và chọn lọc với các kháng nguyên bao gồm protein, peptid, acid nucleic, hormone, các chất chuyển hóa... Để phát hiện được các phân tử này, một kháng nguyên hoặc kháng thể được đánh dấu bằng cách sử dụng

enzyme, trong đó phosphatase kiềm (ALP), horseradish peroxidase (HRP), β -galactosidase thường được sử dụng. Kháng nguyên trong pha lỏng được cố định trên pha rắn bằng phương pháp hóa lý hoặc phản ứng kết hợp kháng nguyên-kháng thể, sau đó kháng nguyên được phản ứng với kháng thể cụ thể và được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp được đánh dấu bằng enzyme - enzyme này xúc tác cho phản ứng sinh màu hoặc huỳnh quang sau khi được bổ sung cơ chất thích hợp được phát hiện bằng việc sử dụng phương pháp quang phổ.

1.4. Các biến thể của ELISA

Mặc dù nguyên tắc của ELISA khá đơn giản, nhưng qua quá trình thực nghiệm sử dụng đã gặp các vấn đề tồn tại: từ các vấn đề về độ nhạy, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện cho đến những vấn đề về tính hiệu quả của phương pháp như thời gian thực hiện, độ phức tạp, chi phí cũng như khả năng hệ thống hóa thành bộ dụng cụ (KIT) để sản xuất công nghiệp. Chính vì vậy, người ta đã không ngừng cải tiến phương pháp này, đưa ra nhiều phương pháp mới phù hợp với từng điều kiện, từng đối tượng khác nhau. Cho đến nay, đã có rất nhiều biến thể đa dạng của ELISA. Tuy nhiên nhìn chung, tất cả các biến thể này có thể được phân loại như sau:

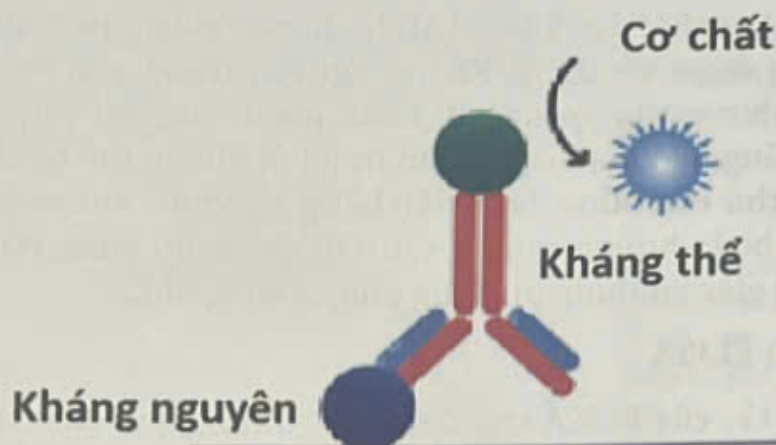
- **ELISA dị pha (*Heterogeneous ELISA*)**, hay còn gọi là ELISA pha rắn (solid phase), gồm các phương pháp:
 - + ELISA trực tiếp (direct ELISA).
 - + ELISA gián tiếp (indirect ELISA).
 - + ELISA sandwich.
 - + ELISA cạnh tranh (competitive ELISA).
- **ELISA đồng pha (*Homogeneous ELISA*)**, gồm các phương pháp ELISA đồng pha cạnh tranh (competitive) và không cạnh tranh (non-competitive).

1.4.1. ELISA dị pha

Trong ELISA dị pha, các yếu tố cần chẩn đoán được tách ra khỏi hỗn hợp dung dịch mẫu bằng cách cố định lên một bề mặt rắn (có thể là nhựa, thủy tinh, giấy, màng nitrocellulose, agarose, polyacrylamide gel hay thậm chí vi khuẩn được cố định) tạo thành hai pha cố định và tự do, theo sau là một bước loại bỏ pha tự do. Yếu tố phát hiện được thêm vào sau đó để phát hiện sự hiện diện của yếu tố cần chẩn đoán còn lại trên pha cố định thông qua hoạt tính của enzyme.

1.4.1.1. ELISA trực tiếp

Phương pháp này ít được sử dụng trong ELISA định lượng mà thường được sử dụng cho ELISA định tính. Yếu tố cần chẩn đoán (ví dụ như kháng nguyên) được cố định trực tiếp lên một bề mặt rắn và sau đó được xác định sự hiện diện bằng yếu tố phát hiện (kháng thể đánh dấu).



Hình 10.3. Sơ đồ minh họa ELISA trực tiếp

Phương pháp này có ưu điểm là chỉ cần một lần ủ do đó tiết kiệm thời gian và tối thiểu được việc kiểm soát các điều kiện trong quá trình thực hiện (thay đổi nhiệt độ và buffer cho mỗi lần ủ, tính thời gian...). Tuy nhiên, nhược điểm của nó là nhuộm màu nền (background staining) cao do sự liên kết không đặc hiệu của kháng thể với bề mặt rắn và các protein cố định trên bề mặt rắn. Việc đánh dấu từng loại kháng thể sử dụng cho mỗi kháng nguyên cũng khá tốn kém, nhất là khi phải chẩn đoán một số lượng lớn các loại kháng nguyên khác nhau. Ngoài ra, phương pháp này cũng có giới hạn phát hiện cao, và cần một lượng lớn các yếu tố cần chẩn đoán do sự liên kết kém hiệu quả của yếu tố này lên bề mặt rắn cũng như sự cạnh tranh của các protein khác trong quá trình phản ứng miễn dịch.

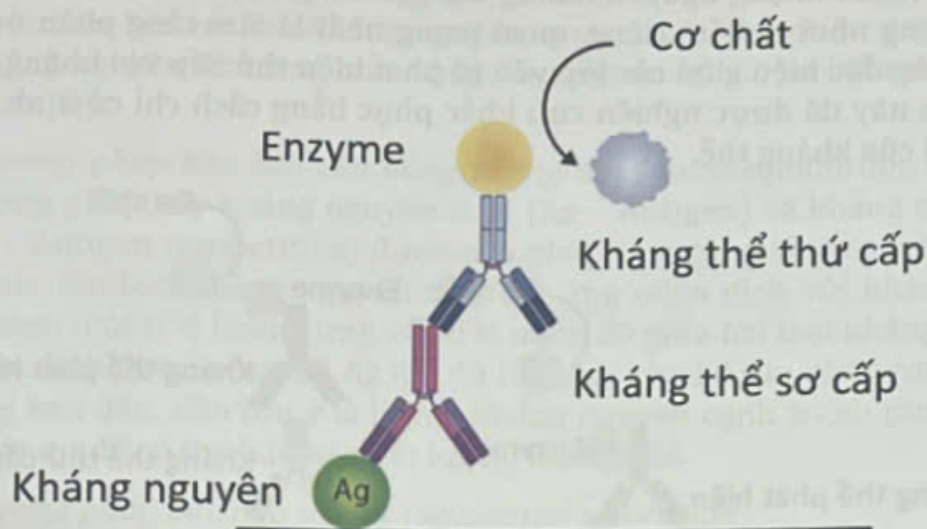
Các bước thực hiện ELISA trực tiếp

1. Cho kháng nguyên mẫu cần phân tích vào đĩa ELISA ủ để cố định kháng nguyên vào đĩa, sau đó rửa loại bỏ thành phần không liên kết.
2. Dung dịch Blocking buffer thêm vào ủ và rửa bằng dung dịch rửa.
3. Thêm kháng thể gắn enzyme ủ và rửa.
4. Thêm cơ chất ủ và rửa.
5. Phân tích kết quả.

1.4.1.2. ELISA gián tiếp

Phương pháp ELISA gián tiếp tương tự như ELISA trực tiếp, nhưng sử dụng hai lớp yếu tố phát hiện, và chỉ có lớp yếu tố phát hiện cuối cùng mới mang enzyme. Ưu điểm của phương pháp này là chỉ cần tạo một loại kháng thể mang enzyme để nhận biết cho nhiều kháng nguyên khác nhau. Kháng thể sơ cấp cũng là những protein, và cũng mang những epitope của riêng nó. Nếu nhiều loại kháng thể khác nhau được sản xuất từ cùng một loài sinh vật, tất cả các loại kháng thể này đều mang những epitope chung đặc trưng cho loài đó. Việc sản xuất một kháng thể có khả năng liên kết với epitope đó là hoàn toàn có thể, thông qua việc tiêm các kháng thể trên vào một loài sinh vật khác. Phương pháp này cũng cho giới hạn phát hiện thấp hơn khoảng 10 lần so với ELISA trực tiếp, do khả năng liên

kết nhiều kháng kháng thể lên một phân tử kháng thể sơ cấp, làm tăng số lượng enzyme được cố định.



Hình 10.4. Hình minh họa ELISA gián tiếp

Tuy nhiên, nhược điểm của nó là tăng số bước thực hiện do đó làm tăng việc kiểm soát các điều kiện quá trình và kéo dài thời gian chẩn đoán. Nhằm tăng khả năng phát hiện, người ta có thể sử dụng kỹ thuật bắc cầu (bridge) hỗ trợ cho ELISA gián tiếp. Về nguyên tắc, kỹ thuật bắc cầu cũng tương tự như ELISA gián tiếp, nhưng ở đây sử dụng nhiều lớp yếu tố phát hiện hơn (trên hai lớp). Qua mỗi lớp yếu tố phát hiện, tín hiệu lại được khuếch đại lên vài lần. Tuy nhiên cần lưu ý là càng nhiều lớp yếu tố phát hiện, số bước thực hiện càng nhiều và sẽ kéo dài thời gian, tăng thêm việc kiểm soát điều kiện cho từng quá trình, cũng như tăng khả năng liên kết chéo giữa các yếu tố phát hiện với nhau.

Các bước thực hiện ELISA gián tiếp tương tự trực tiếp tuy nhiên thêm 1 bước gắn và ủ rửa kháng thể sơ cấp.

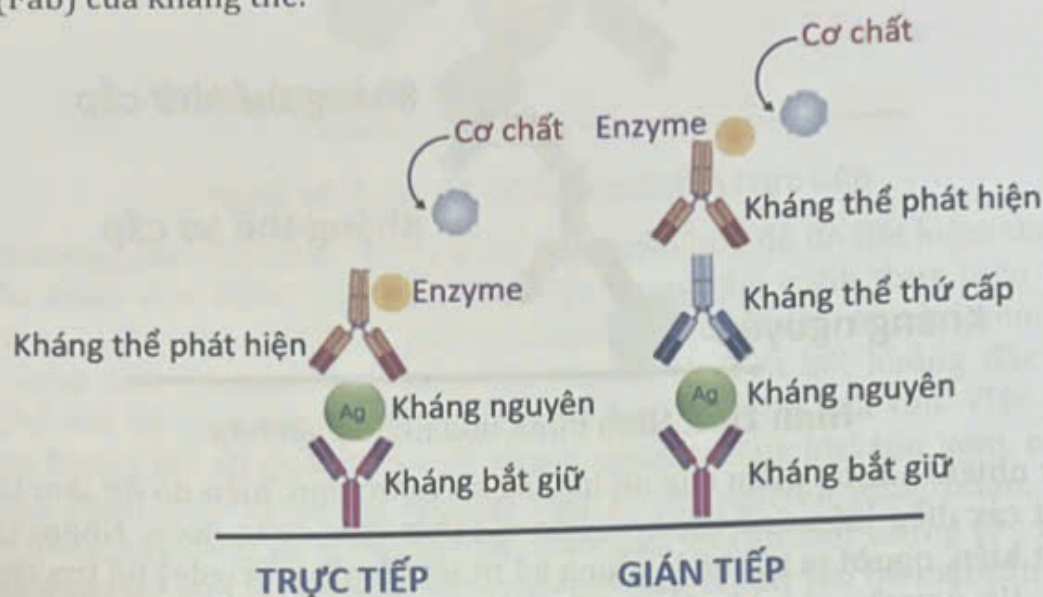
1.4.1.3. ELISA sandwich

Tương tự như ELISA trực tiếp và gián tiếp, trong phương pháp này yếu tố cần chẩn đoán cũng được cố định lên bề mặt rắn. Tuy nhiên việc cố định này không được thực hiện trực tiếp mà thông qua liên kết miễn dịch với một yếu tố phát hiện (thường là kháng thể) đã được gắn cố định sẵn trên bề mặt rắn.

Sau khi bắt giữ yếu tố cần chẩn đoán, lúc này phương pháp quay lại tương tự như ELISA trực tiếp hoặc gián tiếp sau khi đã cố định yếu tố cần chẩn đoán. Người ta có thể sử dụng một kháng thể liên kết enzyme để xác định trực tiếp yếu tố trên (như ELISA trực tiếp), hoặc cũng có thể dùng một trong số các phương pháp bridge của ELISA gián tiếp. Bên cạnh kháng thể người ta cũng có thể cố định một số yếu tố khác lên mặt rắn như Clq, receptor, lectin...

Phương pháp này có khá nhiều ưu điểm vượt trội, thứ nhất là giảm được hiện tượng nhuộm màu nền và các phản ứng không đặc hiệu do đã loại bỏ được hầu hết

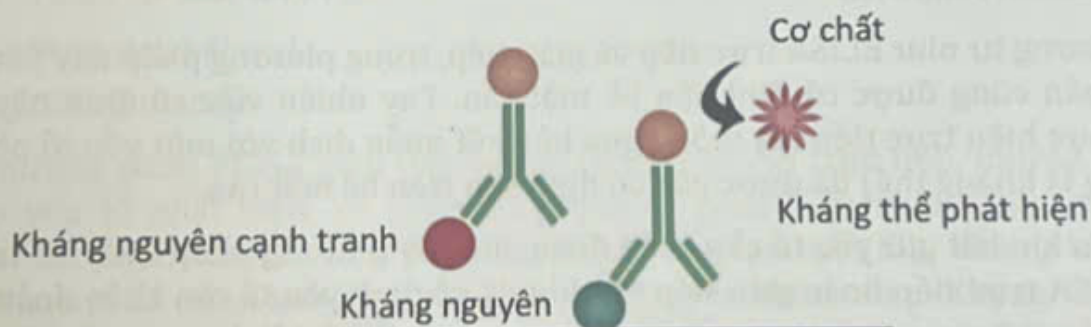
các thành phần tạp, phản ứng được thực hiện dễ dàng hơn, kháng thể sơ cấp có thể được gắn sẵn trên bề mặt rắn tạo thành các bộ KIT và có thể thực hiện các chẩn đoán mà trong đó kháng nguyên không thể gắn được lên mặt rắn. Bên cạnh đó nó cũng có những nhược điểm riêng, quan trọng nhất là làm tăng phản ứng chéo do liên kết không đặc hiệu giữa các lớp yếu tố phát hiện thứ cấp với kháng thể sơ cấp. Nhược điểm này đã được nghiên cứu khắc phục bằng cách chỉ cố định phần đoạn nhánh (Fab) của kháng thể.



Hình 10.5. Sơ đồ minh họa phương pháp ELISA Sandwich

Các bước của ELISA sandwich tương tự ELISA trực tiếp trực tiếp/gián tiếp tuy nhiên trong ELISA sandwich yếu tố bắt giữ kháng nguyên là kháng thể nên bước đầu tiên của phương pháp là gắn kháng thể lên đĩa ELISA. Các bước tiếp theo tương tự ELISA gián tiếp và trực tiếp.

1.4.1.4. ELISA cạnh tranh



Hình 10.6. Sơ đồ minh họa phương pháp ELISA cạnh tranh

ELISA cạnh tranh là phương pháp ELISA rất hiệu quả cho định lượng các yếu tố hiện diện trong mẫu với lượng nhỏ. ELISA cạnh tranh sử dụng một lượng kháng

nguyên cùng loại với kháng nguyên muốn định lượng trong mẫu (kháng nguyên cạnh tranh) cho phản ứng miễn dịch với cùng một loại kháng thể đặc hiệu cố định trên mặt rắn, sau đó đo lượng kháng nguyên cạnh tranh này thông qua hoạt tính enzyme được liên kết với nó. Kháng nguyên cạnh tranh càng hiện diện nhiều cho biết loại kháng nguyên đó trong mẫu càng ít và ngược lại. Có ba biến thể chính của phương pháp này:

- *Phương pháp bão hòa cân bằng tương đối (quasi-equilibrium saturation):*
Trong phương pháp này kháng nguyên mẫu (Ag – Antigen) và kháng nguyên cạnh tranh (Agc – Antigen competitive) được cho phản ứng cùng lúc với một kháng thể được cố định. Hai loại kháng nguyên sẽ phản ứng miễn dịch với kháng thể (Ab – anti body) theo một tỉ lệ tương ứng với tỉ lệ nồng độ giữa hai loại kháng nguyên, từ đó có thể xác định được nồng độ Ag khi đo tỉ lệ Agc còn lại sau phản ứng với lượng Agc sử dụng ban đầu. Cần lưu ý là lượng kháng nguyên cạnh tranh phải được biết trước và phải dư để có thể bão hòa hết lượng kháng thể.

- *Phương pháp bão hòa thứ tự (sequential saturation):*

Phương pháp này thường được sử dụng hơn bão hòa cân bằng tương đối. Khác với phương pháp trên, với bão hòa thứ tự kháng nguyên mẫu được cho phản ứng trước. Sau đó, một lượng dư kháng nguyên cạnh tranh được thêm vào để bão hòa lượng kháng thể còn trống. Hoạt tính enzyme đo được sẽ cho biết lượng Agc phản ứng với kháng thể còn trống, từ đó tính được lượng Ag đã chiếm chỗ kháng thể. Trong phương pháp này, lượng Agc ban đầu không cần phải biết trước, tuy nhiên vẫn cần phải dư để bão hòa lượng kháng thể còn lại.

- *Phương pháp ức chế kháng thể (antibodies inhibition):*

Thay vì cố định kháng thể lên mặt rắn, người ta cũng có thể cố định kháng nguyên cạnh tranh. Đầu tiên, người ta sẽ cho kháng nguyên mẫu phản ứng với một lượng kháng thể biết trước. Sau đó, lượng kháng thể còn lại chưa phản ứng sẽ được phản ứng với kháng nguyên cạnh tranh, và được cố định lại. Sau bước rửa lượng kháng thể còn cố định lại được đo và suy ra lượng kháng thể đã phản ứng với kháng nguyên mẫu. Bên cạnh việc định lượng kháng nguyên, phương pháp này còn có thể sử dụng để so sánh các kháng nguyên với nhau.

1.4.2. ELISA đồng pha

Phương pháp này thường được sử dụng để định lượng các phân tử nhỏ. Khác với RIA và ELISA dị pha, phương pháp này không cần bước tách biệt các yếu tố gắn kết và tự do, vì nó dựa trên sự thay đổi hoạt tính của enzyme thông qua phản ứng liên kết miễn dịch. Ưu điểm lớn của phương pháp này là giảm được mức độ phức tạp của phản ứng trong việc cố định các yếu tố lên bề mặt rắn, thời gian thực hiện rất nhanh cũng như giảm được lượng kháng thể cần dùng vì không phải tráng một bề mặt rắn lớn. Tuy nhiên nó có nhược điểm là hầu hết các phương pháp làm thay đổi hoạt tính enzyme cho đến nay đều dựa trên sự thay đổi về cấu trúc không gian của các yếu tố gắn kết với enzyme. Hướng đi này cần có những thiết kế chính xác về cấu trúc không gian của các thành phần, một yêu cầu khá phức tạp, tốn kém, hầu hết chỉ

có thể áp dụng được với các kháng nguyên nhỏ và gây rất nhiều hạn chế trong việc sản xuất các thành phần của một phản ứng ELISA. Đây cũng là yếu tố chính đã giới hạn rất lớn kỹ thuật ELISA đồng pha. Ngoài ra, kết quả có thể bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố khác trong mẫu có khả năng làm biến đổi hoạt tính enzyme.

2. ỨNG DỤNG CỦA PHƯƠNG PHÁP ELISA

Phương pháp ELISA được ứng dụng trong nhiều xét nghiệm chẩn đoán. Một số xét nghiệm có thể kể đến như:

2.1. Phát hiện và đo lường sự hiện diện của kháng thể trong máu

- Các tự kháng thể (anti-dsDNA, anti-dsg1, ANA,...).
- Các kháng thể chống lại bệnh truyền nhiễm (vi khuẩn, virus, nấm).

2.2. Phát hiện và ước tính các dấu ấn ung thư

- Kháng nguyên đặc hiệu của tuyến tiền liệt (PSA).
- Carcinoembryonic Antigen (CEA).

2.3. Phát hiện và định lượng nồng độ hormone trong máu

- LH (Luteinizing hormone).
- FSH (Follicular stimulating hormone).
- Prolactin.
- Testosterone.
- hCG (Human chorionic gonadotropin).

2.4. Phát hiện sự hiện diện của virus trong mẫu bệnh phẩm

- Cholera.
- HIV.
- Influenza.

2.5. Phát hiện lạm dụng ma túy

- Amphetamine.
- Methamphetamine.
- 3,4-methylenedioxymethamphetamine.
- Cocaine.
- Benzoyllecgonine.

3. CẤU TRÚC CƠ BẢN CỦA HỆ THỐNG MÁY

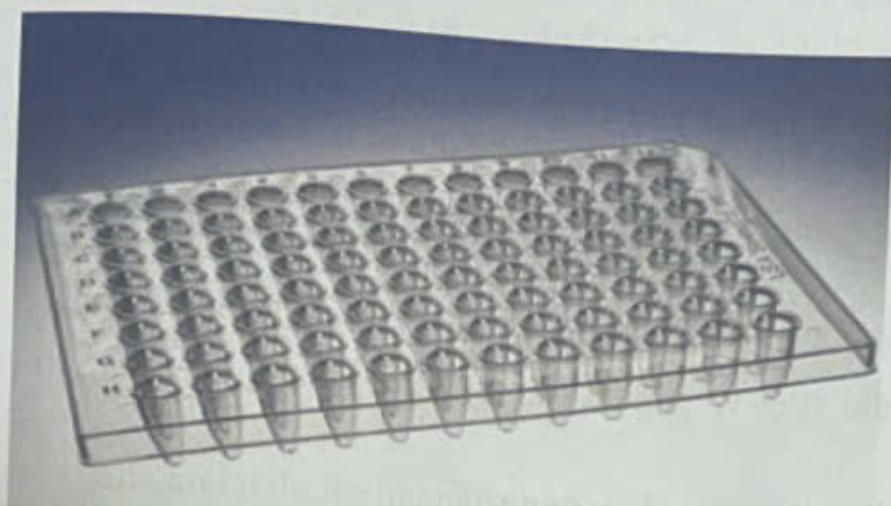
Hệ thống máy ELISA hiện nay được phân chia ra làm 2 nhóm:

- Hệ thống bao gồm các máy đơn lẻ hoạt động theo từng bước từng giai đoạn của quá trình thực hiện phản ứng ELISA: máy ủ, máy rửa, máy đọc.
- Hệ thống tích gộp các modul trong cùng một máy.

3.1. Hệ thống máy đơn lẻ

Cấu trúc cơ bản của hệ thống này bao gồm các thành phần: đĩa ELISA pha rắn, hóa chất, máy ủ, máy rửa, máy đọc.

3.1.1. Đĩa ELISA pha rắn



Hình 10.7. Đĩa ELISA 96 giếng

Đĩa ELISA 96 giếng được sử dụng nhiều nhất trong ELISA thường là polystyrene hoặc các dẫn xuất của polystyrene thu được bằng cách biến đổi hóa học hoặc chiếu xạ bề mặt. Phổ biến nhất là đĩa 96 giếng được cấu trúc gồm 8 hàng và 12 cột. Mỗi giếng có thể tích khoảng 350 μl với một khu vực bên trong có diện tích khoảng 2,5 cm^2 . Gần đây hơn, đĩa 384 giếng và 1536 giếng đã được phát triển với kích thước tổng thể giống như truyền thống 96 giếng. Chúng được sử dụng trong việc thực hiện phân tích với số lượng mẫu lớn. Ngoài ra, cũng có đĩa 96 giếng với giếng bằng một nửa thể tích giếng truyền thống. Phân tích được thực hiện trong các giếng với thể tích bằng một nửa giống hệt về hiệu suất với đĩa kích thước truyền thống, nhưng tiết kiệm đáng kể về thành phần phản ứng. Phần đáy của giếng được thiết kế đáy hình lòng chảo giúp cho việc vệ sinh giếng dễ dàng hơn.

Một số vấn đề liên quan đến đĩa ELISA pha rắn có thể ảnh hưởng đến kết quả phân tích ELISA.

- Vấn đề về chất lượng đĩa ELISA: đĩa ELISA là nơi mà thành phần cần phân tích sẽ bám dính (pha rắn) để các phản ứng tiếp theo có thể xảy ra. Bám dính có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua kháng thể bắt. Dù là bám dính bằng cách nào thì đĩa ELISA cũng là nơi giúp cố định phân tử cần phân tích. Khi có vấn đề với đĩa ELISA: đĩa sử dụng nhiều lần, đĩa hết hạn sử dụng sẽ ảnh hưởng đến quá trình gắn làm cho các phân tử phân tích không gắn/giảm gắn sẽ dẫn tới sai số trong kết quả phân tích (giảm nồng độ thực tế), hoặc đĩa bị xước/bề mặt trong trơn nhẵn sẽ dẫn

tới sự bám quá mức của các phân tử sẽ làm tăng tín hiệu đầu ra làm kết quả phân tích cao hơn thực tế.

- Một vấn đề nữa với quy trình thực hiện của hệ thống các modul rời, quá trình phân tích kết quả sẽ được thực hiện thông qua phương pháp đo quang trên chính đĩa ELISA nên nếu đĩa ELISA quá hạn sử dụng bị mờ đục, bám bẩn giảm chất lượng sẽ ảnh hưởng đến cường độ chùm tia ló dẫn đến làm sai lệch kết quả đo.

Một số lưu ý khi sử dụng đĩa ELISA nhằm hạn chế sai kết quả:

- Đưa đĩa ELISA về nhiệt độ phòng trước khi mở.
- Lượng chất lỏng trong giếng nên đồng đều trong cả đĩa, vì một giếng tách ra độc lập sẽ gây khó khăn cho việc đổ bỏ đĩa và dẫn đến rửa kém hơn.
- Đặt đĩa trong bóng tối ngay sau khi thêm cơ chất, vì cơ chất rất nhạy cảm với ánh sáng.
- Giữ chặt đĩa khi xả để tránh đĩa trượt khỏi bệ giữ (holder).
- Xoay đĩa 180° và gắn lại vào bệ/cần sử dụng đúng bệ giữ nếu không phù hợp với đĩa.
- Đóng kín các giếng chưa dùng đến với các chất làm khô.
- Ghi lại ngày lần đầu tiên mở túi chứa đĩa.
- Rửa mặt đáy của đĩa với dung dịch đệm rửa để loại bỏ dấu vân tay.
- Chắc chắn rằng các giếng đang ở đúng giai đoạn trong quá trình rửa, bổ sung thuốc thử và đọc đĩa.
- Lau phía dưới các đĩa với vải/khăn trước khi đọc.
- Không được để khô giếng một khi đã bắt đầu thí nghiệm.

3.1.2. Pipet

Có 2 loại pipet thường được sử dụng là pipet đa kênh và pipet đơn kênh. Pipet đơn kênh chia làm 2 dạng: cố định thể tích và điều chỉnh thể tích (1- 20 ml, 10- 100 ml, 20- 200 ml...), còn pipet đa kênh thường được dùng là loại 8 đầu tip và 12 đầu tip để phù hợp với số lượng hàng và cột của đĩa ELISA. Về thao tác có thể chia thành pipet phân phối bán tự động và pipet phân phối hoàn toàn tự động. Đối với hệ thống máy ELISA rời từng modul (Ủ, rửa, đọc) các thao tác pha loãng mẫu, thêm hóa chất sẽ được thực hiện bằng các pipet bán tự động. Trên hệ thống tích hợp nhiều modul các quá trình này sẽ được thực hiện tự động hoàn toàn.



Hình 10.8. Pipet hút mẫu (Đơn kênh và đa kênh)

Một số vấn đề với pipet có thể ảnh hưởng đến kết quả phân tích ELISA:

- Đối với trường hợp của hệ thống các máy rời sử dụng pipet bán tự động những vấn đề liên quan đến pipet chủ yếu là do người sử dụng. Có thể kể ra một số nguyên nhân như: cài đặt thể tích hút mẫu không đúng, thao tác với pipet chưa thành thạo không đúng kỹ thuật dẫn đến lượng mẫu hút nhiều/ít hơn so với thể tích cần lấy. Pipet không được hiệu chuẩn định kỳ dẫn đến những sai sót trong thể tích hút mẫu.

Phương pháp hạn chế sai số:

- Pipet phải được hiệu chuẩn thường xuyên theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Tránh chạm đầu tip vào thành giếng.
- Tránh văng vào mẫu và thuốc thử.
- Sử dụng một đầu tip mới khi thêm mẫu/đối chứng/thuốc thử.
- Các đầu tip phải đủ độ dài để cung cấp khoảng không khí giữa đầu tip và pipet.
- Đảm bảo đầu tip pipet được gắn chặt vào pipet để tránh làm rơi đầu tip.

3.1.3. Hóa chất ELISA

3.1.3.1. Dung dịch đệm

a. Coating buffer

Coating là bước đầu tiên trong bất kỳ phương pháp ELISA nào và là quá trình mà một kháng nguyên pha loãng thích hợp hoặc một kháng thể được ủ cho đến khi được hấp thụ vào bề mặt của giếng. Sự hấp phụ xảy ra thụ động như là kết quả của sự tương tác hydro giữa các chuỗi amino acid trên bề mặt kháng nguyên hoặc kháng thể được sử dụng để phủ và bề mặt nhựa của giếng. Khả năng gắn phụ thuộc vào thời gian, nhiệt độ, và pH của coating buffer cũng như nồng độ của lớp phủ. Các điều kiện ủ điển hình là việc thêm 50-100μl chất đệm phủ vào kháng nguyên hoặc

kháng thể ở nồng độ 1-10 $\mu\text{g/ml}$, và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4° C hoặc trong 1-3 giờ ở 37° C (điều kiện thường được sử dụng trong thực tế) trong quá trình phủ bề mặt độ ẩm cũng là một điều kiện hết sức quan trọng để giảm thiểu sự bốc hơi. Chất liệu được sử dụng có thể đảm bảo rằng tấm có thể được sử dụng lại nhiều lần. Hai dung dịch đệm phủ thường được sử dụng trong thực tế là đệm bicarbonate pH 9,6 và dung dịch PBS (dung dịch muối đệm phosphate).

b. Blocking buffers

Blocking là một bước hết sức quan trọng và cần thiết để ngăn chặn sự gắn không đặc hiệu của các thành phần kháng thể phát hiện (detection antibodies) với bề mặt giếng sau khi bao phủ kháng nguyên kháng thể. Có hai type dung dịch blocking chính là protein và chất tẩy rửa. Protein được coi là chất blocking lâu dài nó được thêm vào sau khi kháng nguyên/kháng thể đã được gắn vào đĩa. Còn các chất tẩy rửa chỉ có tác dụng blocking tạm thời chức năng blocking của nó sẽ biến mất trong các bước rửa sau đó.

Chất blocking lý tưởng là sự phối hợp thỏa mãn hai điều kiện đảm bảo độ nhạy của phản ứng ELISA và chất lượng màu nền tối ưu. Lựa chọn protein không liên quan hoặc một protein không có phản ứng với các thành phần kháng thể tham gia phản ứng ELISA là điểm đầu tiên được đề nghị để tìm chất blocking phù hợp. Khi một giếng được blocking hoàn toàn độ nhạy của phản ứng sẽ được tăng lên do giảm sự gắn không đặc hiệu của các thành phần khác. Blocking buffer cơ bản nhất bao gồm BSA 1% (Albumin huyết tương bò) hoặc là protein sữa hòa tan trong dung dịch PBS. Thông thường 150 μl blocking buffer được thêm vào giếng và ủ ở nhiệt độ 37°C.

c. Đệm rửa (Washing buffer)

ELISA sử dụng bề mặt liên kết để tách và bước rửa được lặp lại giữa mỗi bước để loại bỏ các thành phần không liên kết. Bước rửa là một phần quan trọng của quy trình và đòi hỏi các giếng phải được đổ đầy dung dịch rửa thường là dung dịch PBS cùng với một nồng độ nhỏ các chất tẩy rửa không ion như Twin-20 (Polysorbate 20- $\text{C}_{58}\text{H}_{144}\text{O}_{26}$). Bước rửa thường được thực hiện 3-5 lần giữa mỗi bước để loại bỏ triệt để các thành phần không tham gia liên kết. Dung dịch rửa thường được giữ lại một thời gian ngắn trên tấm. Thành phần dung dịch dư thừa phải loại bỏ ở bước rửa cuối cùng để tránh sự pha loãng dung dịch được thêm vào ở giai đoạn tiếp theo. Điều này có thể thực hiện đơn giản bằng cách úp nhẹ tấm lên bề mặt giấy thấm.

d. Kháng thể

Kháng thể sử dụng trong phản ứng ELISA có thể đơn dòng hoặc đa dòng hoặc phối hợp cả hai loại. Sự kết hợp kháng nguyên kháng thể được mô tả theo 3 đặc tính: tính đặc hiệu, ái tính, háo tính. Tính đặc hiệu dựa trên phản ứng kết hợp đặc hiệu của paratop và epitop. Ái tính mô tả mức độ, khả năng gắn kết của kháng nguyên kháng thể. Kháng thể ái lực cao là sự lựa chọn tốt nhất cho các loại xét nghiệm miễn dịch trong đó có ELISA vì chúng nhanh chóng tạo ra một lượng lớn phức hợp miễn dịch ổn định và do đó cung cấp một độ nhạy cao hơn cho xét nghiệm.

Kháng thể đơn dòng có thể được sử dụng trong tất cả các bước của phương pháp ELISA. Kháng thể đa dòng thường được kết hợp sử dụng như là một phân tử được dùng để bắt kháng nguyên để tăng cường tín hiệu, làm tăng khả năng bắt giữ kháng nguyên từ một dung dịch mẫu.

Kháng thể gắn thường được gắn với enzyme **HRP (Horseradish peroxidase)**. Với việc sử dụng cơ chất là **TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine)**. Phản ứng tạo ra phức chất có màu xanh đo ở bước sóng 655nm, phản ứng có thể dừng lại với acid sunfuric tạo ra hỗn dịch màu vàng đo ở bước sóng 450nm.

Các vấn đề với hóa chất

- Như đã trình bày khả năng gắn phụ thuộc vào pH của coating buffer khi dung dịch này không được bảo quản đúng hoặc hết hạn sử dụng sẽ làm ảnh hưởng tới bước phủ kháng nguyên lên bề mặt cụ thể là giảm gắn sẽ dẫn đến kết quả phân tích thấp hơn thực tế.

- Với hóa chất Blocking khi xảy ra vấn đề với nó sẽ làm cho các phân tử khác không phải kháng nguyên có thể gắn lên bề mặt phân tích dẫn tới nhiễu màu nền làm sai số kết quả đo.

- Dung dịch rửa bị biến tính hay bị nhiễm sẽ làm tăng tín hiệu nền.

- Các kháng thể bản chất là protein nên rất dễ biến tính nếu bảo quản không đúng nhiệt độ, pH phù hợp.

- Các cơ chất dễ biến tính khi tiếp xúc với ánh sáng.

Để khắc phục vấn đề với hóa chất nên kiểm tra kỹ hạn sử dụng trước khi sử dụng. Bảo quản đúng các yêu cầu về nhiệt độ ánh sáng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Ghi ngày mở lên chai hóa chất.

3.1.4. Máy ủ ELISA



Hình 10.9. Máy ủ ELISA

Máy ủ ELISA cho phép người sử dụng cài đặt thời gian ủ và nhiệt độ ủ thích hợp tùy theo từng giai đoạn của phản ứng ELISA. Ngoài ra một số hệ thống máy còn kết hợp với xoay trộn đều mẫu trong quá trình ủ để tăng hiệu quả của phản

ứng kết hợp. Để đảm bảo quá trình phản ứng là tối ưu nhất ngoài các thông số về nhiệt độ và thời gian yếu tố độ ẩm duy trì bên trong buồng ủ cũng là một điều kiện quan trọng. Nó ảnh hưởng đến khả năng hóa chất bị bay hơi.

Một số vấn đề với máy ảnh hưởng đến kết quả đo:

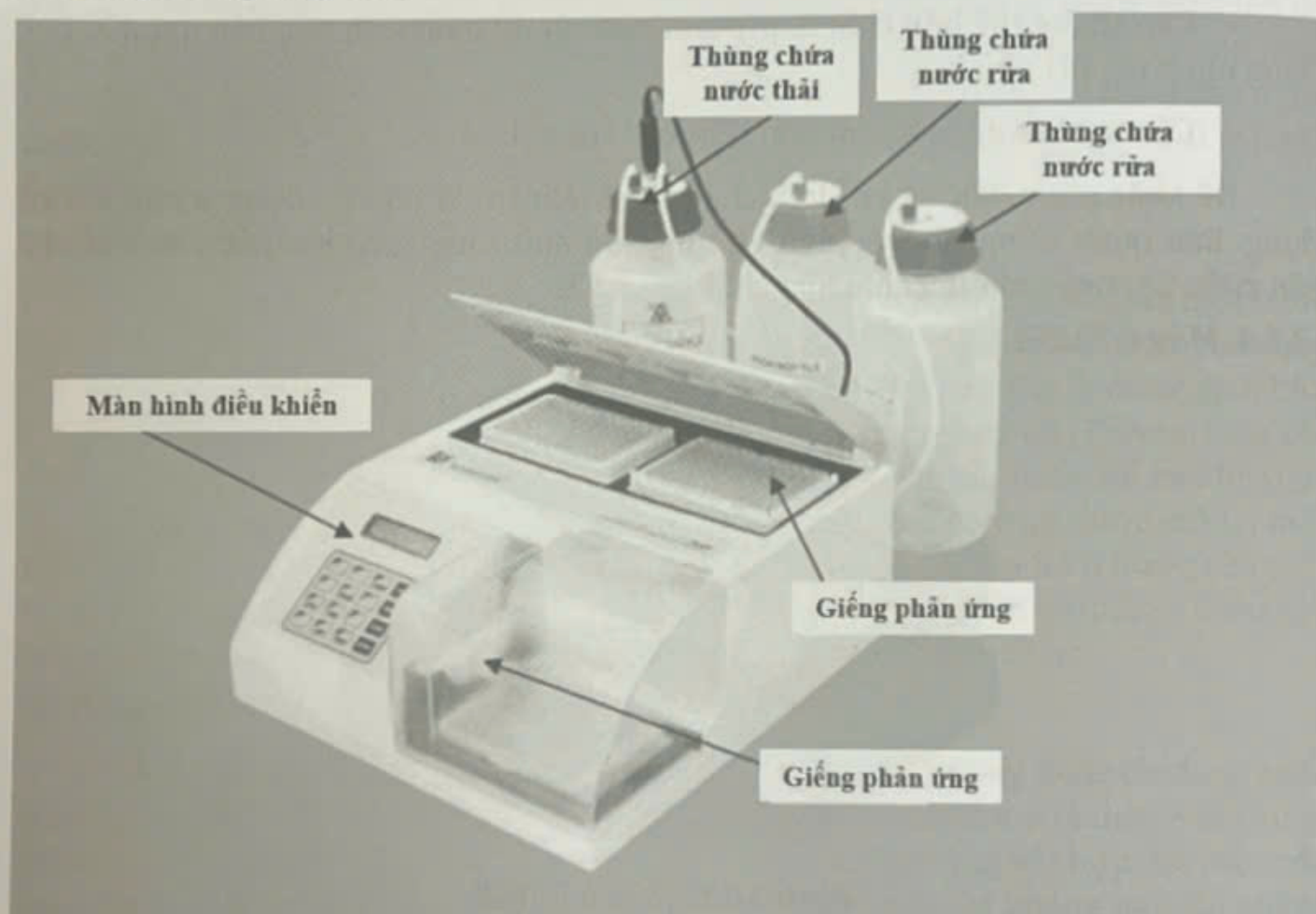
- Nhiệt độ ủ quá thấp/quá cao: nếu nhiệt độ ủ quá thấp sẽ dẫn tới phản ứng kết hợp kháng nguyên kháng thể, kháng nguyên với đĩa ELISA bị giảm sẽ dẫn đến tín hiệu đo được giảm so với thực tế. Nếu ở nhiệt độ cao ở mức vừa phải chưa đủ làm biến tính protein thì tín hiệu thu được sẽ cao hơn so với thực tế, tuy nhiên nếu nhiệt độ quá cao làm biến tính kháng thể thì kết quả phân tích sẽ thay đổi theo chiều ngược lại.

- Thời gian ủ: không đủ thời gian ủ phản ứng xảy ra chưa đạt trạng thái cân bằng khi phân tích kết quả sẽ giảm so với thực tế.

- Độ ẩm thường yêu cầu độ ẩm $> 85\%$ nhằm mục đích hạn chế sự bay hơi của hóa chất phản ứng.

Để hạn chế sai sót có thể xảy ra cần: cài đặt thời gian, nhiệt độ phù hợp với từng giai đoạn của phản ứng.

3.1.5. Hệ thống máy rửa



Hình 10.10. Máy rửa ELISA

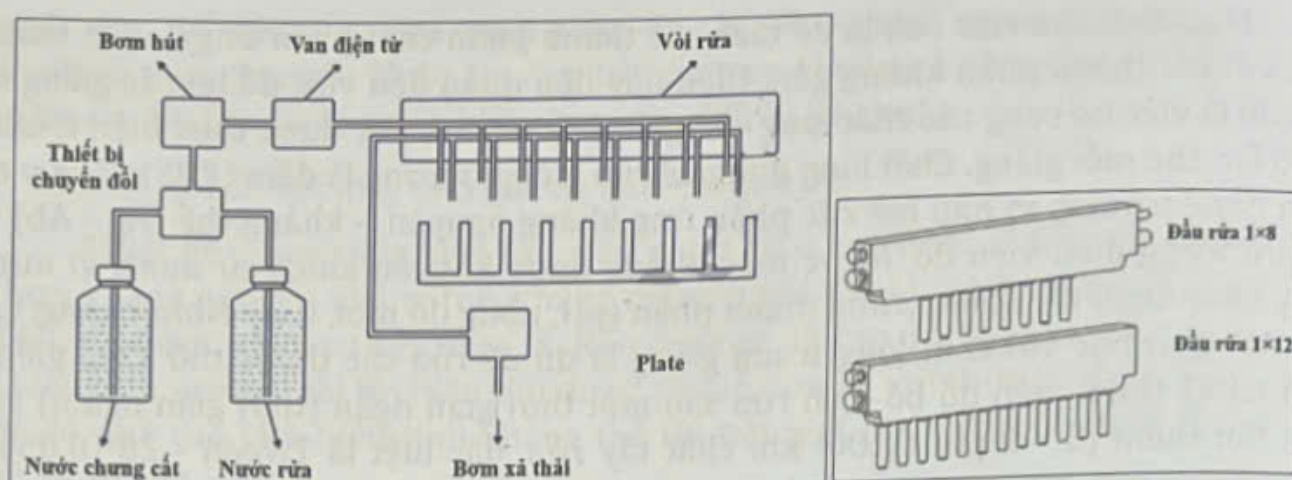
Mục đích của việc rửa là để tách các thành phần chất phản ứng/huyết thanh gắn với các thành phần không gắn. Điều này liên quan đến việc đổ bỏ các giếng và sau đó là việc bổ sung các chất lỏng vào giếng. Quá trình này được thực hiện ít nhất 3 - 6 lần cho mỗi giếng. Chất lỏng dùng để rửa giếng thường là đệm (PBS) để duy trì tính đẳng trương, vì hầu hết các phản ứng kháng nguyên - kháng thể (Ag - Ab) là tối ưu trong điều kiện đó. Nước máy không được khuyến khích sử dụng, vì nước máy khác nhau rất nhiều trong thành phần (pH, nồng độ mol, v.v.). Nhìn chung, các tác động cơ học với chất lỏng trong giếng là đủ để rửa các thuốc thử khỏi giếng. Một số kỹ thuật viên đổ bỏ dịch rửa sau một thời gian ngắn (thời gian ngâm) sau mỗi lần thêm (1 - 5 phút). Đôi khi chất tẩy rửa, đặc biệt là Tween - 20 (0,05%) được thêm vào điều này có thể gây ra sự tạo bọt quá mức dẫn đến điều kiện rửa kém, vì không khí bị mắc kẹt và ngăn ngừa dung dịch rửa tiếp xúc với bề mặt. Đối với hầu hết các trường hợp, việc bổ sung này không đóng góp đáng kể vào quá trình rửa. Khi sử dụng chất tẩy rửa, phải thực hiện sao cho không ảnh hưởng xấu đến chất phản ứng (biến tính kháng nguyên), và hơn nữa là cần ngăn ngừa bọt trong giếng.

- **Rửa bình thường:** Trong đĩa rửa thủ công (bằng tay), yếu tố quan trọng nhất là mỗi giếng đều được rửa, do đó, không để bong bóng không khí bị mắc kẹt trong giếng hoặc không được chạm ngón tay lên cạnh của giếng.

- **Strip/Máy rửa:** Lập trình chu kỳ rửa khác nhau cho từng mẫu, bảo dưỡng cẩn thận là cần thiết, vì chúng dễ bị lỗi máy, chẳng hạn như có một vòi phun đặc biệt bị chặn.

Hệ thống máy rửa ELISA có thể chia thành các loại như sau: có thể rửa một hàng hoặc cột tại một thời điểm, có thể rửa một lúc cả đĩa hoặc rửa một lần nhiều đĩa. Là một hệ thống vi xử lý thực hiện các thao tác rửa được cài đặt chương trình theo yêu cầu của người sử dụng, nó được thiết kế để rửa tất cả các giếng trong một hàng hoặc cột trong cùng lúc. Các giao thức được lập trình để các giếng được rửa theo cách tương tự nhau. Các chu kỳ rửa khác nhau của các hàng hoặc các cột có thể được áp dụng theo yêu cầu của người sử dụng, tính năng cơ bản của máy rửa ELISA:

- Màn hình lớn hiển thị giao diện người dùng.
- Nó chấp nhận rửa các microplate có cấu trúc khác nhau.
- Người sử dụng có thể cài đặt thời gian rửa thời gian ngâm, lượng chất rửa sử dụng trong mỗi lần rửa theo yêu cầu của mình. Có thể cài đặt rửa theo hàng, theo cột có thể bỏ qua một số hàng/cột nếu người dùng cài đặt yêu cầu.
- Thao tác rửa hoàn toàn tự động, tự động định vị vị trí rửa.
- Hệ thống chất thải tự động cảm ứng và báo người dùng khi đầy.



Hình 10.11. Cấu trúc của máy rửa ELISA

Cấu trúc cơ bản của máy rửa ELISA bao gồm các thành phần cơ bản:

- Dung dịch rửa.
- Bộ phận bơm tạo áp lực.
- Van điều hòa kiểm soát áp lực.
- Hệ thống kim rửa.
- Giá đỡ đĩa ELISA.
- Kênh thoát nước rửa.

Các vấn đề về máy rửa ảnh hưởng tới kết quả đo:

- Ống hút hóa chất rửa bám dính dẫn tới bán tắc làm lượng hóa chất rửa được hút không đủ.
- Bơm rửa với áp lực quá cao làm ảnh hưởng đến sự gắn kết của các thành phần kháng nguyên kháng thể.
- Hệ thống kim rửa bị tắc hoặc bán tắc: nếu tình trạng này xảy ra với kim phân phối hóa chất/kim hút rửa/cả hai kim các thành phần không phản ứng sẽ không được loại bỏ sẽ làm sai kết quả đo.
- Hệ thống thoát chất thải rửa bị tắc sẽ dẫn đến sự nhiễm nước xả thải vào mẫu.

Khắc phục vấn đề bằng bảo dưỡng hằng ngày sau khi làm việc: rửa sạch kim rửa, làm thông thoáng hệ thống ống phân phối hóa chất rửa hệ thống xả thải. Đổ nước thải sau cuối ngày làm việc/khi thiết bị báo đầy.

Bảo quản thiết bị

Thiết bị nên để trên ghế cao cách mặt đất ít nhất 1m, nhiệt độ phòng 18- 35°C, độ ẩm dưới 85%, tránh tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời.

Ngoài hệ thống máy rửa hoàn toàn tự động còn có hệ thống rửa bán tự động, và rửa thủ công hoàn toàn. Đối với hai phương pháp này rất dễ gặp sai sót phụ thuộc rất nhiều vào kinh nghiệm của người thực hiện.



Hình 10.12. Máy rửa bán tự động
3.1.6. Máy đọc kết quả ELISA

Hình 10.13. Thiết bị rửa thủ công



Hình 10.14. Máy đọc ELISA

3.1.6.1. Thành phần cấu trúc cơ bản:

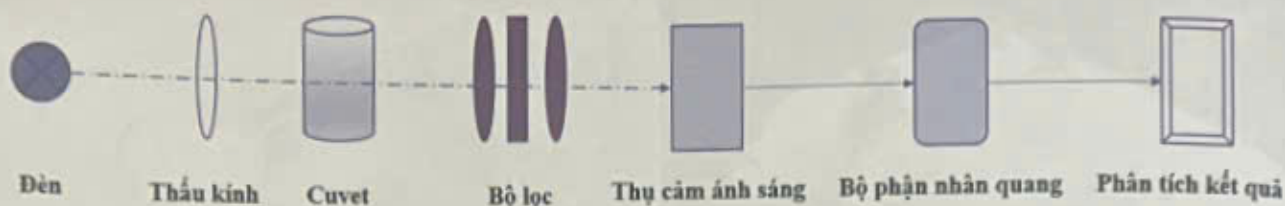
- Màn hình giao diện.
- Giá đặt Plate Elisa.
- Hệ thống quang học.
- Bộ phận nhận cảm, khuếch đại tín hiệu.
- Bộ phận phân tích kết quả.
- In kết quả.

Tương tự máy rửa ELISA, máy đọc ELISA cũng chia thành 3 nhóm: có thể đọc một hàng hoặc cột trong một lần, có thể đọc kết quả của cả đĩa cùng một lần hoặc đọc kết quả nhiều đĩa cùng một lúc.

3.1.6.2. Nguyên lý hoạt động của máy

Dựa trên nguyên lý phương pháp quang phổ (như đã được trình bày ở nội dung bài Phương pháp quang phổ và hệ thống hóa sinh tự động).

Cấu trúc cơ bản của máy gồm có 2 bộ phận chính: hệ thống phân tích và máy in. Trong đó hệ thống phân tích cấu tạo bao gồm hệ thống quang học (bộ lọc với các bước sóng khác nhau), hệ thống phát hiện đa kênh, hệ thống điều khiển đĩa phản ứng và chip đơn. Hệ thống có thể phát hiện đĩa 48 hoặc 96 giếng.



Hình 10.15. Sơ đồ hoạt động của máy

Một số yếu tố ảnh hưởng đến kết quả đọc:

- Cường độ ánh sáng của đèn quá yếu hoặc quá mạnh.
- Hệ thống kính lọc không đảm bảo, không cho ra được chùm sáng đơn sắc.
- Hệ thống thấu kính bị giảm chất lượng, bị đục, xước sẽ ảnh hưởng tới cường độ chùm tia tới.
- Các vấn đề với đĩa ELISA đã trình bày ở trên.
- Tế bào quang điện kém nhạy cảm.

3.1.7. Một số biện pháp giúp hạn chế sai số

Bảo trì

- Giữ cho môi trường lưu trữ khô ráo và sạch sẽ để tránh ẩm, ăn mòn, tránh xa nguồn gây nhiễu điện từ mạnh.
- Dụng cụ đã được hiệu chuẩn trước khi rời nhà máy. Người dùng không được phép tháo gỡ và điều chỉnh. Bất kỳ khiếm khuyết nào, vui lòng liên hệ với nhà sản xuất.
- Trong sử dụng bình thường, không cần phải thay thế các bộ phận chức năng thông thường, trong khi một số bộ phận đặc biệt cần phải được thay thế nếu cần thiết.
- Chuẩn bị và kiểm tra trước khi sử dụng.

Khi cắm điện và khởi động máy, máy sẽ tự động kiểm tra. Nếu có lỗi xảy ra đối với thiết bị hệ thống sẽ thông báo lỗi ở màn hình hiển thị. Kỹ thuật viên sử dụng cần lưu ý và khắc phục lỗi xảy ra được cảnh báo trước khi sử dụng. Trước khi sử dụng nên để máy làm ấm trước khi cho mẫu vào phân tích kết quả.

- Chạy mẫu chuẩn kiểm tra đầu ngày.
- Bảo trì máy:

Máy yêu cầu vệ sinh hằng ngày sau quá trình sử dụng. Nhưng một số thành phần của máy được yêu cầu kiểm tra thay thế để đảm bảo sự chính xác về kết quả phân tích.

- *Bộ lọc*: Sau một thời gian sử dụng tốc độ truyền của bộ lọc sẽ bị giảm khi đó máy sẽ báo gợi ý cho người sử dụng để kiểm tra hệ thống lọc. Kỹ thuật viên nên

liên hệ nhà sản xuất để được hỗ trợ thay thế. Để đảm bảo sự chính xác trong quá trình xét nghiệm, bộ lọc nên được thay thế bởi chuyên gia của hãng khi gặp vấn đề.

- Đèn: Thay thế nguồn ánh sáng. Kiểm tra bất thường nguồn sáng trong bảng các lệnh kiểm tra tự động của hệ thống để kiểm tra các bất thường cường độ nguồn sáng theo các tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Nếu có bất thường thiết bị sẽ cảnh báo yêu cầu người sử dụng thay thế. Liên hệ với nhà sản xuất để biết nguồn sáng mới khi chu kỳ sống của nguồn ánh sáng kết thúc sau khi sử dụng lâu dài. Để thay thế định kỳ.

3.2. Hệ thống tích gộp các modun

Hệ thống phân tích ELISA tự động là một hệ thống kết hợp nhiều modun của quá trình thực hiện phản ứng ELISA khác nhau vào trong một hệ thống duy nhất với ít sự tham gia của các yếu tố con người trong đó. Cấu trúc cơ bản của hệ thống này thực chất là sự tích hợp vai trò của các máy đơn lẻ như đã được trình bày ở trên vào trong một thiết bị duy nhất. Cấu trúc của một thiết bị này bao gồm: Bộ phận phân phối, bộ phận hút mẫu/hóa chất phản ứng, bộ phận phản ứng, bộ phận phân tích.

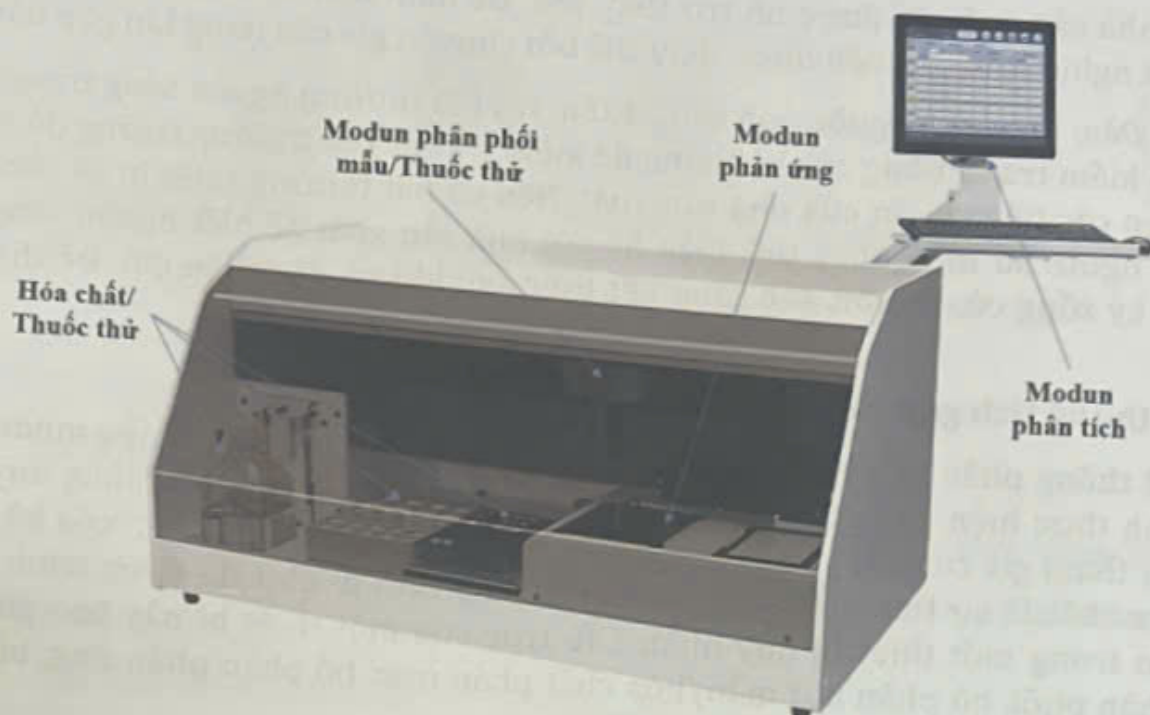
- Bộ phận phân phối mẫu trong hệ thống máy ELISA tự động chịu trách nhiệm trong việc mã hóa, lưu dữ liệu và phân phối mẫu dưới sự kiểm soát của hệ thống điện tử.

- Bộ phận hút mẫu/hóa chất đóng vai trò trong hút mẫu bệnh phẩm, hóa chất cho việc thực hiện phản ứng ELISA. Thể tích hút mẫu (yêu cầu thể tích mẫu bệnh phẩm cho phản ứng) và thể tích hóa chất thay đổi tùy theo hệ thống máy và loại xét nghiệm thực hiện. Các kim hút sau khi thực hiện hút và phân phối các kim hút được rửa và làm sạch tại các trạm rửa để thực hiện các phản ứng tiếp theo.

- Bộ phận phản ứng là nơi xảy ra các phản ứng kết hợp kháng nguyên kháng thể, các quá trình rửa loại bỏ các thành phần không phản ứng.

- Buồng ủ duy trì điều kiện phản ứng ở một nhiệt độ ổn định tối ưu cho quá trình phản ứng.

- Bộ phận đo quang: Đo các giá trị OD của các giếng phản ứng và dựa vào đường chuẩn đã được xây dựng để tính toán ra giá trị nồng độ của chất cần phân tích nhờ các chuyển đổi tín hiệu quang học thành tín hiệu điện ở hệ thống phân tích kết quả.



Hình 10.16. Máy xét nghiệm ELISA tự động

LÀM SẠCH

- Dụng cụ: Thường xuyên vệ sinh bên ngoài thiết bị bằng vải mềm làm ẩm bằng nước và một chất tẩy rửa nhẹ hoặc nếu cần một chất khử trùng.
- khay chứa mẫu có thể được làm sạch bằng chất tẩy rửa gia dụng thông thường hoặc xà phòng và nước (lau khô bằng vải trước khi sử dụng).
- Không nhúng thiết bị hoặc bất kỳ đầu vào nào vào bất kỳ chất lỏng hoặc chất tẩy rửa nào.
- Không đổ bất kỳ chất lỏng hoặc chất tẩy rửa nào vào bất kỳ thiết bị nào đang mở.
- Không sử dụng dung môi mạnh để vệ sinh thiết bị.
- Không vệ sinh bất kỳ cổng đầu vào hoặc cổng giao tiếp nào với bất kỳ chất lỏng hoặc làm sạch nào chất tẩy rửa trừ khi đại diện hoặc nhân viên được ủy quyền có đã phê duyệt quy trình đó.

XỬ LÝ CHẤT THẢI

- Giấy máy in không thể tái chế được và nên xử lý như chất thải còn lại.
- Hệ thống đệm chất lỏng và chất tẩy rửa pha loãng có thể được tháo ra.
- Chất thải F cần được coi là có khả năng lây nhiễm và phải được thải bỏ theo quy trình phòng thí nghiệm địa phương cho vật liệu biohazard.
- Test strip sẽ được thải bỏ theo quy trình phòng thí nghiệm tại cơ sở thực hành cho vật liệu nguy hại. Khử trùng cho vật liệu sinh học có khả năng lây nhiễm (mẫu bệnh phẩm) hoặc chất thải có thể bị ô nhiễm có khả năng lây nhiễm vật liệu sinh học.

Bảo trì hàng ngày

Ít nhất mỗi ngày một lần khởi động lại thiết bị để rửa hệ thống kim hút bằng System Fluid để tránh tắc nghẽn.

Các kim của các trạm rửa được rửa sạch bằng đệm rửa và được giữ trong Wash Buffer trong 30 giây. Các trạm bơm kim tiêm được xả bằng System Fluid và giữ trong 3 giây.

Bảo trì hàng tuần

Mỗi tuần một lần làm sạch hoàn toàn tất cả các thùng chứa thuốc thử (System Fluid, Wash Buffer, waste) bằng cách sử dụng bàn chải và chất tẩy rửa trong phòng thí nghiệm có sẵn trên thị trường. Sau làm sạch hộp chứa thuốc thử rửa kỹ bằng nước ion khử.

Bảo trì hàng tháng

Thực hiện định kỳ xả rửa hàng tháng để làm sạch hệ thống ống bên trong của thiết bị.

Phần mềm hệ thống được cập nhật kiểm tra định kỳ 12 ± 2 tháng/lần.

Bảng 10.1. Các vấn đề và biện pháp khắc phục

Vấn đề	Giải pháp khắc phục
Hóa chất phản ứng	Kiểm tra HSD trước khi sử dụng để phân tích, bảo quản hóa chất đúng điều kiện hướng dẫn của nhà cung cấp.
Kim hút, kim rửa mẫu bị tắc hoặc bán tắc	Thiết bị báo lỗi trên màn hình chính, tiến hành lau kim khi có lỗi, bảo dưỡng lau kim cuối ngày bằng nước cất và gạc sạch hoặc dung dịch TWIN.
Hóa chất rửa bị nhiễm hoặc hết hạn sử dụng.	Kiểm tra và thay thế dung dịch mới, kiểm tra hạn sử dụng trước khi thay.
Vấn đề với hệ thống đo quang	Tương tự máy đọc trong hệ thống modun rời.
Nhiệt độ buồng ủ không đảm bảo	Kiểm tra đầu ngày trên hệ thống. Nhiệt độ gia động cho phép là $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên lý của phương pháp ELISA
2. Trình bày ưu nhược điểm của các phương pháp ELISA
3. Trình bày các thành phần cấu trúc cơ bản của máy xét nghiệm ELISA
4. Trình bày các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng xét nghiệm ELISA và biện pháp đảm bảo chất lượng xét nghiệm