

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 7786:2007**

**ISO 14675:2003**

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – HƯỚNG DẪN MÔ TẢ CHUẨN  
VỀ CÁC PHÉP PHÂN TÍCH MIỄN DỊCH ENZYM  
CẠNH TRANH – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AFLATOXIN M<sub>1</sub>**

*Milk and milk products – Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays – Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> content*

HÀ NỘI – 2007

**Lời nói đầu**

TCVN 7786:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 14675:2003;

TCVN 7786:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

**Lời giới thiệu**

Các phương pháp độc quyền như phương pháp ELISA không thể mô tả trong các tiêu chuẩn riêng rẽ. Do đó, mục đích của tiêu chuẩn này nhằm đưa ra các hướng dẫn về các thông số cơ bản cần thiết để đánh giá/xác nhận các phép phân tích miễn dịch enzym cạnh tranh để định lượng aflatoxin M<sub>1</sub> trong sữa và sản phẩm sữa.

Một vài dạng phép thử định lượng hoá học miễn dịch có sẵn hiện hành, cùng chung nguyên tắc cơ bản của phân tích miễn dịch enzym cạnh tranh. Tuy nhiên, do dạng phép thử về phân tích vi đĩa 96 giếng thường được sử dụng đối với hầu hết các phép định lượng, nên các thông số được nêu trong tiêu chuẩn này được chấp nhận riêng biệt cho dạng phép thử này và có thể không cần thiết phải áp dụng toàn bộ cho dạng phép thử khác.

## Sữa và sản phẩm Sữa – Hướng dẫn mô tả chuẩn về các phép phân tích miễn dịch enzyme cạnh tranh – Xác định hàm lượng aflatoxin M<sub>1</sub>

*Milk and milk products – Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays – Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> content*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn về sử dụng các phương pháp sàng lọc dùng để xác định hàm lượng aflatoxin M<sub>1</sub> trong sữa và sản phẩm sữa, dựa vào các phép phân tích miễn dịch enzyme cạnh tranh.

Về mục đích hợp pháp, các kết quả phân tích miễn dịch enzyme dương tính cần phải thử khẳng định bằng phương pháp chuẩn đã được chấp nhận. Tuy nhiên, tùy thuộc vào phép thử tuân theo các yêu cầu dưới đây, mà các phép phân tích miễn dịch enzyme có thể được sử dụng để kiểm soát chất lượng thông thường, đặc biệt khi cần chứng minh sự không có mặt aflatoxin M<sub>1</sub> trên giới hạn qui định.

### 2 Nguyên tắc

Các phương pháp hoá học miễn dịch được dựa trên khả năng liên kết của các kháng thể với các chất cụ thể. Việc kết hợp thuận nghịch giữa các kháng thể và các kháng nguyên tương ứng của chúng được gọi là phản ứng phản ứng miễn dịch học. Lực liên kết kéo theo là các tương tác phân tử yếu, như các lực Coulomb và van der Waals, giống như các liên kết hydro và liên kết kỵ nước.

Phản ứng kháng nguyên-kháng thể được dựa vào qui luật của tác dụng khối lượng và lượng kháng thể hoặc kháng nguyên có mặt trong hỗn hợp phản ứng có thể được suy ra từ qui mô phản ứng.

## TCVN 7786:2007

"Chất lượng" phép phân tích miễn dịch là một hàm số của nguyên tắc hoá học miễn dịch của phương pháp, đặc tính của thuốc thử, kiểu loại phép phân tích và sai số thực nghiệm. Các nguyên tắc cơ bản này xác định độ nhạy, tính đặc thù, độ chụm và độ đúng của phương pháp.

Liên quan đến nguyên tắc của phương pháp, có sự khác biệt giữa các các phương pháp cạnh tranh và không cạnh tranh.

Về lý do thực tế, các phương pháp này cần kháng nguyên được đánh dấu hoặc kháng thể được đánh dấu để quan sát được phản ứng kháng nguyên-kháng thể.

Các phương pháp cạnh tranh được dựa trên sự cạnh tranh của kháng nguyên tự do ( $A_g$ ) và kháng nguyên được đánh dấu ( $A_g^*$ ) đối với một lượng giới hạn các vị trí liên kết kháng thể ( $AB$ ).

Ở dạng biểu đồ, nguyên tắc hoá học miễn dịch này có thể được thể hiện theo công thức sau đây:

$$A_g + A_g^* + AB = A_g AB + A_g^* AB + A_g + A_g^*$$

Trong phần lớn các trường hợp, phép phân tích cho thấy có kháng nguyên liên kết đánh dấu, nhưng về nguyên tắc mọi phép đo sự phân bố kháng nguyên đánh dấu là có thể.

Để phát hiện các hợp chất khối lượng phân tử thấp như mycotoxin mà nó chỉ chiếm một vị trí liên kết kháng thể (epitop), thì phép phân tích cạnh tranh là bắt buộc. Để có sự phân biệt giữa các chất phản ứng tạo phức và chất không phản ứng, phần lớn các phép phân tích sử dụng kháng thể (phân tích cạnh tranh trực tiếp) hoặc kháng nguyên (phân tích cạnh tranh gián tiếp) kết hợp với pha rắn làm chất hấp thụ miễn dịch. Còn tất cả các thuốc thử mà không liên kết bởi kháng thể có thể dễ dàng loại ra bằng cách "rửa" pha rắn.

### 3 Phân tích miễn dịch enzym aflatoxin M<sub>1</sub>

Dựa vào thông tin đưa ra trong các nguyên tắc chung của phép phân tích miễn dịch (xem điều 2), khuyến cáo rằng phương pháp ELISA để xác định aflatoxin M<sub>1</sub>, cần tuân thủ các yêu cầu đưa ra trong bảng 1.

Bảng 1 – Yêu cầu về thông số của phép phân tích

Thông số	Yêu cầu
<b>Kháng thể</b> Nguồn	Vô tính đơn dòng hoặc vô tính đa dòng
<b>Kháng nguyên đánh dấu</b> Enzym đánh dấu Kiểu	Peroxidaza cải ngựa Aflatoxin B <sub>1</sub> hoặc peroxidaza cải ngựa-oxim-M <sub>1</sub>
<b>Dạng phân tích</b> Nguyên tắc hoá học miễn dịch Kiểu Thời gian	Phân tích enzym cạnh tranh Phân tích vi đĩa 96 giếng 3 h đến 4 h
<b>Độ nhạy của phép phân tích</b> Nồng độ AFM <sub>1</sub> choc độ hấp thụ tương đối <sup>1</sup> : 80 % 50 %	< 20 ng/l < 50 ng/l
<b>Tính đặc thù của phép phân tích</b> Khả năng phản ứng chéo với aflatoxin M <sub>1</sub> Khả năng phản ứng chéo với các aflatoxin khác (xuất hiện trong sữa)	100 % < 20 %
<b>Thiết kế thống kê</b> Các chuẩn - các bản sao - các độ pha loãng - dải nồng độ (ng/ml) Các mẫu - các bản sao - các độ pha loãng	2 hoặc nhiều hơn 6 hoặc nhiều hơn kể cả chuẩn zero từ 5 ng/l đến 50 ng/l hoặc khoảng rộng hơn  2 hoặc nhiều hơn nếu cần
<b>Tính toán</b> Sự trùng khớp đường chuẩn	Gắn với trục bậc ba, mô hình logic bốn thông số, hồi qui tuyến tính (chỉ phần tuyến tính của đường chuẩn) <sup>b</sup>
<b>Độ chụm</b> Các chuẩn - hệ số biến thiên lặp lại của độ hấp thụ tương đối - hệ số biến thiên tái lập của độ hấp thụ tương đối Các mẫu - giới hạn lặp lại (ng/kg) - giới hạn tái lập (ng/kg) - giới hạn phát hiện (ng/kg) - giới hạn định lượng (ng/kg)	< 10 % < 20 %  < 100 ng/kg ở mức 200 ng/kg (sữa bột) < 150 ng/kg ở mức 200 ng/kg (sữa bột) < 5 ng/kg (sữa) < 10 ng/kg (sữa)
<b>Chuẩn bị mẫu</b>	Loại chất béo bằng ly tâm; hoàn nguyên sữa bột (thành dung dịch)
<b>Độ thu hồi</b>	>80 % đối với dải từ 10 ng/kg đến 50 ng/kg (sữa) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Độ hấp thụ chuẩn hoặc mẫu/độ hấp thụ chuẩn zero x 100

<sup>b</sup> Xem các thông số thống kê trong 6.3

<sup>c</sup> Hiệu chỉnh độ thu hồi thường không cần thiết

## 4 Độ nhạy

Độ nhạy của bất kỳ phép phân tích miễn dịch nào cũng đều liên quan trực tiếp đến ái lực của kháng thể và có thể tính được nếu biết trước hằng số cân bằng (xem [2]). Vì phản ứng kháng nguyên-kháng thể có thể được mô tả bằng cách sử dụng phản ứng động học cũng như công thức nhiệt động học, nên thời gian và nhiệt độ cũng có ảnh hưởng đến độ nhạy của phép phân tích.

## 5 Tính đặc thù

Sau độ nhạy thì tính đặc thù khi thực hiện phép phân tích là quan trọng đối với phương pháp hoá học miễn dịch. Về nguyên tắc, phản ứng đặc thù trong miễn dịch học có thể xác định như sau: *khi có mặt các phân tử khác nhau, thì các kháng thể đặc thù chỉ liên kết với một dạng phân tử.*

Khả năng hình thành liên kết "sai" xác định tính đặc thù của phản ứng. Nói cách khác, tính đặc thù được xác định bằng cách đánh dấu ba chiều của kháng nguyên và kháng thể cũng như bằng số lượng tương tác phân tử xảy ra giữa hai phân tử. Về tính đặc thù đòi hỏi cần xem xét cả cấu trúc kháng nguyên và tính đồng nhất hoặc không đồng nhất của các kháng thể.

Việc chuẩn bị kháng thể là đồng nhất nếu các kháng thể chỉ kết hợp với một và cùng một epitop, cho dù với ái lực khác nhau. Điều kiện này được thực hiện bởi các kháng thể vô tính đơn dòng, nhưng cũng có thể bởi huyết thanh miễn dịch dựa theo các hợp chất có khối lượng phân tử thấp (haptenes). Mặt khác, việc chuẩn bị kháng thể là không đồng nhất nếu nó chứa các quần thể kháng thể khác nhau đặc trưng cho các epitop khác nhau.

Về cơ sở phân tử khả năng phản ứng chéo "thật sự" diễn tả trường hợp mà trong đó có ít nhất hai kháng nguyên khác nhau trên cùng một vị trí cạnh tranh liên kết kháng thể. Phần lớn khả năng phản ứng chéo được quan sát trong các phép thử cạnh tranh sử dụng các kháng thể vô tính đơn dòng hoặc kháng huyết thanh đối với các hợp chất phân tử thấp. Trong thực tiễn, điều này có nghĩa là nồng độ đủ cao của các chất phản ứng chéo thực sự cho kết quả giống như các chất "thích hợp" trong phân tích cạnh tranh.

Điều quan trọng cần chú ý là các ảnh hưởng không đặc thù lên phép phân tích (ví dụ: các ảnh hưởng của chất nền) thường không thể phân biệt được với ảnh hưởng đặc thù của các chất phản ứng chéo. Trong cả hai trường hợp, độ nhạy của phép phân tích là như nhau và thu được kết quả dương tính giả hoặc âm tính giả. Tuy nhiên, do nguyên lý phân tích miễn dịch, nên các kết quả âm tính giả là không giống như trong phép phân tích cạnh tranh.

## 6 Thông số thống kê

### 6.1 Khái quát

Nói về các thông số thống kê ảnh hưởng đến "chất lượng" của phân tích miễn dịch thì cần chú ý rằng

các phương pháp thống kê thông thường để xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, khả năng tái lập, ... cũng được áp dụng cho phép phân tích miễn dịch. Tuy nhiên, một vài thống số ảnh hưởng đến độ chụm trong phép phân tích (độ lặp lại) và độ đúng của các kết quả phân tích miễn dịch điển hình cho phân tích miễn dịch enzym dùng các vi đĩa 96 giếng.

Đối với phép phân tích thường nhật, các phương pháp này thường qui định số lượng giếng để chuẩn bị đường chuẩn và số lượng cố định về phân tích kép các chất chuẩn và các mẫu, cũng như số lượng dung dịch pha loãng đối với từng mẫu.

## 6.2 Độ chụm

Trong 6.1 có hai yếu tố ảnh hưởng đến độ chụm ước tính phạm vi lớn. Yếu tố thứ nhất là vị trí các giá trị độ hấp thụ quan sát được trên đường hiệu chuẩn. Yếu tố thứ hai là số lượng phép thử kép được sử dụng cho mỗi mẫu thử.

Do hình dạng không tuyến tính của đường hiệu chuẩn, mà số đọc của độ hấp thụ gần với 50 % liên kết tương đối cho nhiều kết quả chính xác hơn các số đọc gần với 100 % và 0 % liên kết không hoàn toàn. Đối với các mục đích thực tế, các kết quả cần phải dao động từ 20 % đến 80 % liên kết không hoàn toàn". Phép đo sẽ trở nên chính xác hơn nếu tăng số lượng phép thử kép như với bất kỳ phương pháp thử nào khác.

## 6.3 Độ chính xác

Độ chính xác dự đoán chủ yếu bị ảnh hưởng bởi độ chính xác của đường hiệu chuẩn. Tuy nhiên, thường không biết trước một cách chính xác đường hiệu chuẩn nhưng được dự đoán từ các số đọc độ hấp thụ của các nồng độ chuẩn trên đĩa. Do đó phương pháp trùng khớp đường chuẩn cũng như số giá trị đường hiệu chuẩn được sử dụng và nồng độ thực của các chất chuẩn xác định độ chính xác của đường hiệu chuẩn. Trong các phương pháp toán học được sử dụng để mô tả đường chuẩn phân tích miễn dịch, chỉ có mô hình logic bốn thông số và gần trục bậc ba được sử dụng để phân tích miễn dịch enzym (xem [2]). Cả hai phương pháp cho các kết quả có thể so sánh được và ít nhất một trong hai phương pháp đó được áp dụng trong nhiều chương trình sẵn có để xử lý số liệu phân tích miễn dịch.

## 7 Kết luận

Cho dù chất lượng tổng thể của phép phân tích miễn dịch là một hàm số phức hợp, mà khó có thể mô tả, một vài yếu tố ảnh hưởng đến các thông số chất lượng phân tích chính được thống kê trong bảng 2 theo cách đơn giản.



**Bảng 2 – Các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp lên các thông số chất lượng chính của phân tích miễn dịch enzym**

Yếu tố	Thông số chất lượng phân tích			
	Độ nhạy	Tính đặc thù	Độ chụm	Độ chính xác
Hoá học miễn dịch - nguyên tắc của phương pháp	Có	Có		
Kháng thể - ái lực - tính đặc thù	Có Không	Không Có	Không	Không
Thuốc thử đánh dấu - hoạt tính - kiểu	Có Có	Không Có		
Các chuẩn - phép thử kép - độ pha loãng			Không Không	Có Có
Các mẫu - phép thử kép - độ pha loãng	Không	Không	Có Có	Không Không
Trùng khớp đường chuẩn			Không	Có
Sai số thực nghiệm	Có	Có	Có	Có
Chuẩn bị mẫu	Có	Có	Có	Có

**CHÚ THÍCH** Liên quan đến tính đặc thù bị hạn chế cũng như khả năng cho kết quả dương tính giả do sự ức chế không đặc thù của phép phân tích, mà cần phải khẳng định các kết quả phân tích miễn dịch về tính hợp pháp và mục đích mang tính pháp lý.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] MARTLBAUER E. Basic principles which determine the quality of immunoassays. *IDF Special Issue No. 9302*, 1983, p. 137.
- [2] RODBARD D., MUNSON P.J and DE LEAN A. *Improved curve-fitting, paralelism testing, characterization of sensitivity and specificity, validation and optimization for radioligand assays*. In: *Radioimmunoassay and ralated procedures in medicine*. Vol. 1, 1977, pp. 469-514. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1978.
-