

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH LIÊN KẾT ENZYME TRỰC TIẾP PHÁT HIỆN DƯ LƯỢNG CHLORAMPHENICOL TRONG SỮA

Hắc Bá Thành¹, Nguyễn Thị Thu², Nguyễn Văn Cường², Nguyễn Thị Diệu Thúy²,
S.A. Eremin³, I.A. Shanin³

TÓM TẮT

Chloramphenicol (CAP) là loại kháng sinh được dùng nhiều trong phòng và điều trị bệnh trong chăn nuôi và thủy sản, vì thế dư lượng của loại kháng sinh này thường tìm thấy trong nhiều sản phẩm như thịt, cá, trứng, sữa,... Do vậy, việc phát triển một công cụ kiểm tra nhanh dư lượng kháng sinh này trong thực phẩm là rất cần thiết. Phản ứng ELISA trực tiếp được thiết lập nhằm xác định dư lượng CAP trong sữa. Trong nghiên cứu này, kháng thể đa dòng kháng CAP, điều chế bằng cách gây miễn dịch trên thỏ, được phủ trên bề mặt của các giếng và ủ qua đêm ở điều kiện 4°C. Phức hợp CAP và enzyme horseradish peroxidase (HRPO) được tổng hợp và sử dụng cho phản ứng miễn dịch cạnh tranh với kháng nguyên CAP tự do và CAP có trong mẫu phân tích. ELISA trực tiếp được tối ưu các yếu tố thành phần như: xử lý mẫu sữa, độ pha loãng kháng thể, độ pha loãng cộng hợp enzyme. Phương pháp ELISA trực tiếp cho phép kiểm tra được CAP trong mẫu sữa trong khoảng 1-10 ng/ml. Áp dụng phương pháp này trong phòng thí nghiệm với 15 mẫu sữa thu trên thị trường, kết quả phát hiện CAP trong 2 mẫu sữa với hàm lượng thấp (1,35 và 3,47 ng/mL) [1,7].

Từ khóa: Dư lượng kháng sinh chloramphenicol, ELISA trực tiếp, sữa.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dư lượng kháng sinh trong thực phẩm hiện là vấn đề quan ngại của hầu hết các cơ quan kiểm soát thực phẩm trên thế giới. Một số loại kháng sinh bản thân nó (Chloramphenicol, malachite green ...) có thể gây ra tác động có hại cho sức khỏe người tiêu dùng, có thể sinh ra những hợp chất có độc tính cao đối với cơ thể sống. Chính vì vậy những kháng sinh này đã bị cấm sử dụng hoàn toàn trong nuôi trồng và bảo quản thực phẩm. Các phương pháp phân tích xác định hàm lượng kháng sinh, độc chất phải thỏa mãn các yêu cầu về giới hạn phát hiện (LOD), khả năng lặp lại (repeatability), thu hồi (recovery). Đã nhiều phương pháp phân tích được nghiên cứu nhằm phát hiện dư

¹ Chuyên viên Sở Tài nguyên và Môi trường Thanh Hóa

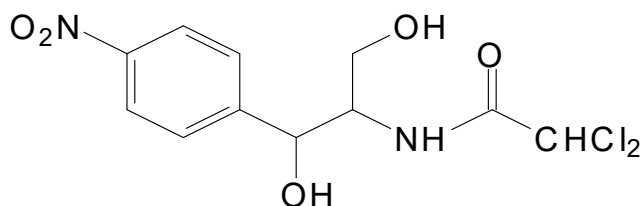
² Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Giảng viên Trường Đại học Tổng hợp Lômônôxốp

lượng kháng sinh Chloramphenicol (CAP) trong thực phẩm như HPLC, MALDI-MS, LC-MS, GC-MS, ... với độ chính xác cao, tuy nhiên, hạn chế của các phương pháp trên là khó thực hiện với các yêu cầu về thiết bị, hoá chất, kỹ thuật sử dụng. Phương pháp ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) là phương pháp miễn dịch dựa trên phản ứng đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể. ELISA được ứng dụng nhiều trong xét nghiệm về y tế, thú y, môi trường... Đặc biệt các phương pháp phân tích được công nhận và áp dụng trong chiến lược kiểm soát dư lượng phải chuẩn hoá theo quyết định số 2002/657/CE (CE,2002) [2,3,6].

Sữa và các sản phẩm chế biến từ sữa là những thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao. Tuy nhiên, dư lượng các chất kháng sinh vẫn còn tồn tại nhiều trong sữa gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe cộng đồng. Để góp phần bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng, môi trường sống và tăng cường kiểm soát dư lượng kháng sinh có trong thực phẩm, việc phân tích và đánh giá dựa trên phương pháp đặc hiệu ELISA là rất cần thiết. Mục đích của nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng ứng dụng phương pháp ELISA trong phân tích tồn dư kháng sinh trong sữa.

CAP thường được gọi là Chlorocid, được phân lập từ nấm *Streptomyces Venezacloe*, nay sản xuất bằng phương pháp tổng hợp toàn phần, thuộc nhóm phenicol. Chúng tan nhiều trong alcohol, hấp thu tốt qua đường tiêu hóa và ngoại tiêu hóa, phân bố đồng đều trong dịch nội và ngoại bào. Do không có tính ion hóa, CAP tan tốt trong lipid, được phân bố rộng khắp các mô trong cơ thể.



Hình 1. Cấu trúc phân tử gốc Chloramphenicol (CAP)

CAP là một kháng sinh phổ rộng, hiệu quả cao và có đặc tính dược động học tốt nhưng giá thành tương đối rẻ, vì thế được sử dụng rộng rãi trong kiểm soát bệnh ở gia súc, gia cầm, thủy sản và bệnh ong,... CAP thường gây ra các triệu chứng rối loạn đường ruột, làm rối loạn quá trình giảm phân của tế bào máu, gây nên bệnh thiếu máu, chất này làm suy thoái nghiêm trọng chức năng của tủy xương. CAP cũng ức chế tổng hợp protein bằng cách gắn vào tiểu thể 50S của ribosom, những tế bào tăng sinh nhanh của động vật có vú. Ngoài ra CAP có thể làm suy yếu hệ xương ở trẻ sơ sinh gây hội chứng "gray syndrome", là do trẻ chưa hình thành cơ chế khử độc (khả năng liên kết với glucuronide ở gan). Tiêu chuẩn châu Âu cho ngưỡng giới hạn (*minimum required performance limit* - MRPL) của CAP là 0,3 µg/kg ở tất cả các thực phẩm có nguồn gốc động vật

(European Council, 1994) [3,5,6].

Nghiên cứu này tiến hành xây dựng phương pháp ELISA trực tiếp phát hiện dư lượng CAP trong sữa tiến hành ở điều kiện phòng thí nghiệm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu: mẫu sữa tươi được thu thập trên địa bàn Hà Nội.

Hóa chất chính sử dụng trong nghiên cứu

Kháng sinh CAP chuẩn (Sigma), kháng thể đa dòng kháng CAP gây miễn dịch trên thỏ (GS Eremin, ĐH Lô-mô-nô-xốp cung cấp); N-N dimethylformamid (DMF), N-hydroxysuccinimid (HIS), N-N dicyclohexylcarbodiimide (DCC), enzyme Horseradish peroxidase (HRP) (Sigma), Tetramethylbenzidin (TMB) - cơ chất của phản ứng ELISA, dung dịch H_2SO_4 2N.

Phương pháp

Sơ đồ phản ứng ELISA trực tiếp xác định hàm lượng CAP:

Xây dựng đường chuẩn của bộ kit ELISA trực tiếp trên cơ sở phân tích dung dịch CAP chuẩn có nồng độ tương ứng là 0; 0,1; 0,2; 0,6; 2; 6; 20 ng/ml.

Cách tiến hành

Tổng hợp cộng hợp kháng nguyên CAP gắn enzyme HRP

Dùng 150 μ l CAP nồng độ 10 mg/ml (hòa trong DMF) để hòa tan lần lượt 1,7 mg HSI và 6,2 mg DCC. Ủ hỗn hợp qua đêm trong điều kiện tối, sau đó tiến hành ly tâm để loại CAP không hòa tan hết. Tiếp theo, lấy 2 mg HRP được hòa tan hoàn toàn, nhẹ nhàng trong 1,5 ml $NaHCO_3$ nồng độ 0,13M (sử dụng khuấy từ). Nhỏ lần lượt từng giọt hỗn hợp CAP đã hoạt hóa vào dung dịch HRP, mỗi giọt cách nhau 3 phút để phản ứng diễn ra từ từ. Hỗn hợp đó được ủ tiếp trong 3 giờ, khuấy nhẹ, điều kiện tối. Cho hỗn hợp qua cột Sephadex G50, và thu các phân đoạn có màu nâu nhạt. Bổ sung lượng tương đương glycerol và bảo quản trong nhiệt độ $0^\circ C$ [4,5,6].

Xây dựng đường chuẩn

Phủ 50 μ l dung dịch kháng thể đa dòng kháng CAP (độ pha loãng 1.000 lần) phủ vào các giếng sau đó ủ qua đêm ở $4^\circ C$. Đã phản ứng được rửa 3 lần bằng đệm rửa PBST1x. Mỗi giếng được bổ sung 50 μ l dung dịch mẫu chuẩn CAP ở các nồng độ trên, sau đó cho thêm 100 μ l dung dịch cộng hợp CAP đã được gắn enzyme HRP (độ pha loãng 400x), ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa các giếng ba lần bằng đệm rửa PBST 1x. Phản ứng màu được tiến hành bằng cách bổ sung 100 μ l dung dịch TMB (cơ chất của phản ứng ELISA) và ủ 45 phút trong tối ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng bổ sung 50 μ l dung dịch H_2SO_4 2N để dừng phản ứng. Sau đó, tiến hành đo OD trên máy ELx808 ở bước sóng 450 nm.

Tiến hành trên mẫu sữa

Mẫu sữa được ly tâm ở 3000 vòng/ phút trong 15 phút, sau đó loại bỏ lớp mỡ phía trên, lấy dung dịch phía dưới. Mẫu sữa được pha loãng bằng nước theo tỉ lệ 1:4. Sau đó pha mẫu sữa với kháng sinh CAP theo công thức 270 μ l sữa với 30 μ l dung dịch kháng sinh ở các nồng độ 0; 1; 5; 10; 20. Cách làm tương tự như mẫu nước nhưng thay dung dịch mẫu nước bằng dung dịch mẫu sữa.

Kết quả đo OD được xử lý và vẽ đồ thị bằng phần mềm OriginPro 8.5.1.

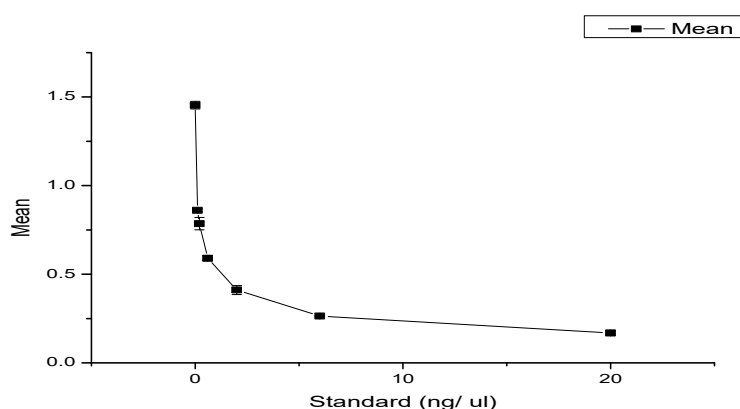
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xây dựng đường chuẩn để kiểm tra dư lượng kháng sinh có trong mẫu nước đo ở các nồng độ pha loãng CAP khác nhau.

Chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn của chất kháng sinh CAP. Khi đo ELISA ở bước sóng 450 nm cho kết quả ở bảng sau:

Bảng 1. Kết quả đo OD của mẫu chuẩn ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ mẫu chuẩn	LOD1	LOD2	Giá trị trung bình	$\pm$ SD
0,0	1,439	1,469	1,4540	0,02121
0,1	0,867	0,854	0,8605	0,00919
0,2	0,810	0,761	0,7855	0,03465
0,6	0,600	0,580	0,5900	0,01414
2,0	0,393	0,429	0,4110	0,02546
6,0	0,265	0,263	0,2640	0,00141
20	0,179	0,158	0,1685	0,01485



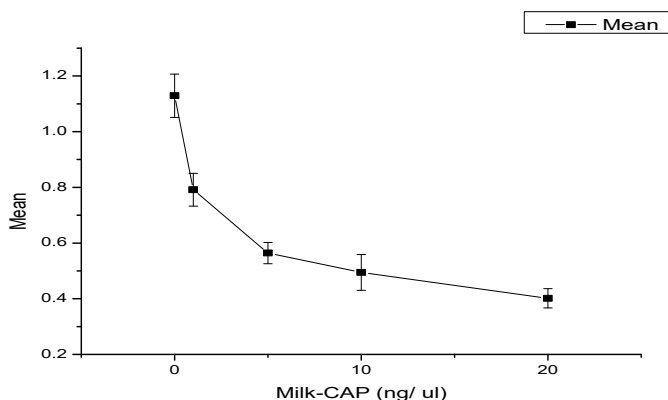
Hình 2. Biểu đồ đường chuẩn của CAP

Dựa vào bảng và biểu đồ ta thấy khi đo mẫu chuẩn ở các nồng độ pha loãng từ 0 - 20 mg/ ml, độ biến đổi của giá trị OD₄₅₀ cho kháng sinh CAP tương ứng là $1,454 \pm 0,02$ và $0,1685 \pm 0,015$. Khi nồng độ pha loãng từ 0 $\rightarrow$ 2 mg/ ml thì giá trị OD₄₅₀ biến đổi nhiều. Với khoảng pha loãng CAP từ 6 $\rightarrow$ 20 mg/ml giá trị OD₄₅₀ đo được biến đổi tương đối ít ($0,265 \pm 0,0014 \rightarrow 0,179 \pm 0,015$). Do vậy có thể xác định chính xác nồng độ kháng sinh CAP trong các mẫu trong khoảng nồng độ từ 0 đến 20 ng/ml.

Xây dựng đường chuẩn để kiểm tra dư lượng kháng sinh có trong mẫu sữa đo ở các nồng độ pha loãng CAP khác nhau. Kết quả thể hiện ở bảng 2 và hình 3.

Bảng 2. Kết quả đo OD của mẫu sữa ở các nồng độ pha loãng CAP

Nồng độ pha loãng CAP trong sữa	LOD1	LOD2	Giá trị trung bình	$\pm$ SD
0	1,184	1,074	1,129	0,07778
1	0,833	0,750	0,7915	0,05869
5	0,591	0,537	0,5640	0,03818
10	0,540	0,449	0,4945	0,06435
20	0,426	0,377	0,4015	0,03465



Hình 3. Biểu đồ đường chuẩn của Chloramphenicol trong sữa

Qua số liệu và biểu đồ cho thấy, nồng độ CAP càng thấp thì giá trị LOD đo được càng cao. Ở mẫu sữa không chứa kháng sinh CAP thì giới hạn và độ nhạy của phản ứng ELISA có giá trị LOD là $1,129 \pm 0,078$. Khi nồng độ kháng sinh CAP cho vào các mẫu sữa biến đổi theo các nồng độ 1, 5, 10, 20 ng/ml thì giá trị LOD tương ứng với giá trị $0,7915 \pm 0,0587$; $0,564 \pm 0,038$; $0,495 \pm 0,064$; $0,4015 \pm 0,0346$. Khoảng xác định của CAP trong mẫu sữa là từ 1-10 ng/ μ L. Với khoảng phát hiện của phương pháp này đáp ứng được nồng độ cho phép của CAP trong các thực phẩm có nguồn gốc động vật là 0,3 μ g/kg.

Có nhiều phương pháp khác nhau để xác định dư lượng CAP đã được áp dụng, bao gồm cả phương pháp sắc ký và miễn dịch. Phương pháp thường được sử dụng tiện lợi hơn cả là phương pháp ELISA, là một phản ứng miễn dịch cạnh tranh sử dụng kháng thể kháng CAP nhằm phát hiện CAP có trong các mẫu thực phẩm. Kỹ thuật này đáp ứng yêu cầu về độ nhạy, tương đối tiện lợi cho người áp dụng. Sử dụng kỹ thuật này trong phòng thí nghiệm, 15 mẫu sữa thu từ các chợ đã được tiến hành phân tích. Kết quả phát hiện được nồng độ CAP trong 2 mẫu sữa với hàm lượng thấp 1,35 và 3,47 ng/mL.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công đường chuẩn của CAP bằng phương pháp ELISA nhằm mục đích phát hiện được lượng tồn dư kháng sinh CAP trong sữa, giới hạn phát hiện CAP trong khoảng nồng độ xác định từ 1,0 ng/ml đến 10 ng/ml đối với mẫu sữa.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này nhận được sự hỗ trợ kinh phí đề tài: “Phát triển kỹ thuật ELISA mới sử dụng kháng thể nhân tạo dưới dạng polymer in dấu phân tử để phát hiện tồn dư thuốc kháng sinh trong thực phẩm” - VAST, HTQT, Nga, 03/13-14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Aarestrup, FM (1999), *Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals*, International Journal of Antimicrobial Agents 12: 279 - 285.
- [2] Bogaard AEVD, Stobberingh EE (2000), *Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans*, International Journal of Antimicrobial Agents 14: 327 - 335.
- [3] European Council, Council Regulation (EEC) (22 June 1994), 2377/90 *laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, amending regulation*, no 1430/94 , Off, J, Eur, Community L15623: 6.
- [4] Fodey T, Murilla G, Cannavan A, Elliott C (2007), *Characterisation of antibodies to chloramphenicol, produced in different species by enzyme-linked immunosorbent assay and biosensor technologies*, Analytica Chimica Acta 592: 51 - 57.
- [5] Gaudin V, Maris P (2001), *Food Agric*, Immunol, 13: 77.
- [6] Rejtharová M, Rejthar L (2009), *Determination of chloramphenicol in urine, feed water, milk and honey samples using molecular imprinted polymer clean-up*, Journal of Chromatography A, 1216 (46): 8246 - 8253.
- [7] http://vet.hcmuaf.edu.vn/data/file/Giao%20trinh%20duoc%20ly_%20Tra%20n%20CHUONG%203%20KH%C3%81NG%20SINH.pdf

DIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) APPLICATIONS DETECT ANTIBIOTICS FOR MILK AND WATER IN VIETNAM

**Hac Ba Thanh, Nguyen Thi Thu, Nguyen Van Cuong, Nguyen Thi Dieu Thuy,
S.A. Eremin, I.A. Shani**

ABSTRACT

Direct ELISA was used for determination of chloramphenicol (CAP) in milk, First, rabbit anti-CAP antibody was coated on 96-well microtiter plate overnight. Conjugates of CAP and horseradish peroxidase (HRP) was synthesized and used for competitive reaction of CAP with CAP antibody which was coated on the surface of well. The method detection sensitivity and specificity in determining the concentration range of 0.1 ng/ml to 20 ng/ml for water samples and 1 ng/ml to 10 ng/ml for the milk samples. Building successful calibration curve to detect the limit of detection of antibiotic residues in milk and water. The method was applied to test 15 real samples of milk which available in the market, and it showed positive result in two samples at low concentration of CAP (1.35 and 3.47 ng/mL).

Keywords: *Chloramphenicol, direct ELISA, milk.*