

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

=====***=====

HẮC BÁ THÀNH

**XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA GIÁN TIẾP
XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG FLUOROQUINOLONE TRONG SỮA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2015

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

=====***=====

**XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA GIÁN TIẾP
XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG FLUOROQUINOLONE TRONG SỮA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: Hóa sinh thực nghiệm

Mã số: 60 42 01 14

Người hướng dẫn khoa học: TS. NGUYỄN THỊ DIỆU THÚY

Học viên: HẮC BÁ THÀNH

Hà Nội - 2015

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	7
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN VỀ TÀI LIỆU.....	9
1.1. Kháng sinh nhóm Fluoroquilone.....	9
1.1.1. Nguồn gốc và sự phát triển của kháng sinh nhóm Fluoroquilone.....	9
1.1.2. Phân loại và cơ chế tác dụng.....	9
1.1.3. Cấu trúc, đặc điểm một số kháng sinh thuộc họ Fluoroquinolone.....	12
1.1.4. Ngưỡng giới hạn cho phép ở một số thực phẩm.....	18
1.2. Các phương pháp xác định hàm lượng kháng sinh nhóm Fluoroquilone.....	22
1.2.1. Phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và sắc ký khối phổ (LC-MS).....	22
1.2.2. Phương pháp ELISA (Enzyme - Linked Immuno sorbent Assay).....	23
1.2.2.1. Nguyên lý phương pháp ELISA.....	24
1.2.2.2. Các phản ứng ELISA.....	25
b. ELISA gián tiếp (indirect ELISA).....	26
c. ELISA cạnh tranh (competitive ELISA).....	28
1.2.3. Ứng dụng phương pháp ELISA.....	29
1.4. Tình hình sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi.....	29
1.5. Tác hại của Fluoroquinolone tồn dư trong thực phẩm.....	30
1.6. Tác hại của Fluoroquinolone đến môi trường.....	31
1.5. Các nghiên cứu trong và ngoài nước sử dụng ELISA phát hiện dư lượng Fluoroquilone.....	32
1.5.1. Các nghiên cứu ngoài nước.....	32
1.5.2. Các nghiên cứu trong nước.....	34
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	36
2.1. Vật liệu nghiên cứu.....	36
2.1.1. Dụng cụ, thiết bị.....	36
2.1.2. Hoá chất.....	36
2.1.3. Các dung dịch đệm.....	37
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	38
2.2.1. Mục tiêu của nghiên cứu.....	38
2.2.2. Địa điểm và đối tượng nghiên cứu.....	38

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	38
2.2.3.1. Nội dung nghiên cứu.....	38
a. Phương pháp tổng hợp hapten gắn LEV với OVA/BSA.....	38
b. Phương pháp tạo kháng thể đa dòng kháng LEV trên thỏ.....	40
c. Phương pháp ELISA gián tiếp xác định dư lượng LEV.....	41
2.2.3.2. Giới hạn phát hiện nồng độ và độ đặc hiệu của nghiên cứu.....	44
2.2.3.4. Đánh giá hiệu suất thu hồi của LEV khi gây nhiễm nhân tạo.....	44
2.2.3.3. Chuẩn bị mẫu sữa.....	45
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	47
3.1. Các thông số phản ứng ELISA gián tiếp.....	48
3.2. Kết quả phản ứng ELISA gián tiếp.....	48
3.5. Đánh giá độ ổn định của phương pháp.....	55
3.6. Phản ứng ELISA để xác định dư lượng LEV trong sữa.....	55
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	56
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	59

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Giới hạn tồn dư tối đa của các Quinolone theo Quyết định số 2377/90/EC của Ủy ban Châu Âu [16].....	19
Bảng 3.1. Kết quả đo OD ₄₅₀ trên phiên ELISA.....	47
Bảng 3.2. Kết quả đo OD ₄₅₀ trên phiên ELISA.....	48
Bảng 3.3. Bảng kết quả hiệu suất thu hồi.....	53
Bảng 3.4. Kết quả xác định hàm lượng LEV ở các mẫu sữa.....	54

DANH MỤC SƠ ĐỒ, HÌNH VẼ

Hình 1. Cấu trúc phân tử gốc Fluoroquinolone.....	8
Hình 2. Cấu trúc phân tử Danofloxacin	11
Hình 3. Cấu trúc phân tử Difloxacin	11
Hình 4. Cấu trúc phân tử Enrofloxacin	12
Hình 5. Cấu trúc phân tử Ibafoxacin.....	13
Hình 6. Cấu trúc phân tử Marbofloxacin	13
Hình 7. Cấu trúc phân tử Orbifloxacin.....	14
Hình 8. Cấu trúc phân tử Sarafloxacin.....	14
Hình 9. Cấu trúc phân tử Levofloxacin.....	15
Hình 10. Sơ đồ các phản ứng ILISA.....	23
Hình 11. Sơ đồ phản ứng ELISA gián tiếp	25
Hình 12. Tổng hợp liên hợp của LEV với OVA (LEV - OVA)	38
Hình 13. Sơ đồ ELISA gián tiếp cạnh tranh	41
Hình 14. Đồ thị tuyến tính nồng độ LEV chuẩn	51
Hình 15. Đồ thị tuyến tính nồng độ LEV chuẩn.....	49
Hình 16. Đồ thị tuyến tính nồng độ LEV chuẩn được xây dựng từ đường chuẩn gốc.....	50
Hình 17. Cấu trúc phân tử của Fluoroquinolone.....	51
Hình 18. Biểu đồ tỷ lệ phản ứng chéo của Fluoroquinolone.....	52

DANH MỤC CÁC TỪ VÀ CÁC KÝ HIỆU VIẾT TẮT

ELISA	Enzym - Link Immuno sorbent Assay
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng cao áp)
GC-MS	Gas Chromatography/Mass Spetrometry (Sắc ký khí - khối phổ)
OD	Optical Density (Mật độ quang học)
TMB	3,3 ', 5,5'-tetramethylbenzidine
EU	Liên minh Châu Âu
FAO	Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc
WHO	Tổ chức y tế thế giới
MRLs	Maximum Residual Limit
FDA	Food and Drug Administration
PBST	Phosphate buffer saline Tween
PBS	Phosphate buffer saline
SD	Standard deviation (độ lệch chuẩn)
HPRO	Horseradish peroxidase
QĐ	Quyết định
TT - BNN	Thông tư - Bộ nông nghiệp

MỞ ĐẦU

Fluoroquilone là một trong những nhóm kháng sinh tổng hợp hoá học, có tác dụng diệt khuẩn rộng hiệu quả, có khả năng ức chế và tiêu diệt vi khuẩn một cách nhanh chóng nên kháng sinh nhóm Fluoroquilone ngày càng được sử dụng nhiều trong phòng và điều trị bệnh trong chăn nuôi và thủy sản. Trước thực trạng nguy cơ và kiểm soát dịch bệnh chưa thật nghiêm ngặt, dư lượng của loại kháng sinh này thường tìm thấy trong nhiều sản phẩm nông nghiệp như thịt, cá, trứng, sữa,... Trong quá trình nuôi dưỡng, nếu không tuân thủ về thời gian dùng thuốc và thời gian sản xuất hoặc chế biến thì sẽ dẫn đến lượng Fluoroquilone còn lại trong thịt, sữa, gia cầm và thủy sản... Việc lạm dụng kháng sinh Fluoroquilone trong phòng bệnh, điều trị, kích thích sinh trưởng hay bảo quản đối với ngành chăn nuôi dẫn đến sự tồn dư kháng sinh trong chăn nuôi, vì thế ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường và sức khỏe người tiêu dùng.

Điều này gây nhiều mối nguy hiểm, hiện tượng kháng thuốc của một số vi khuẩn như: *Salmonella*, *Campylobacter spp*, *Escherichia coli*,... hậu quả là giảm hiệu quả của kháng sinh nói chung, kháng sinh dòng Fluoroquilone nói riêng đối với các chủng vi khuẩn. Để bảo vệ người tiêu dùng ở châu Âu, tổ chức EU đã thiết lập giới hạn lớn nhất (MRLs) đối với dư lượng thuốc kháng sinh trong nguồn thực phẩm khi cung cấp cho con người vào năm 1990. Theo sự kiểm tra và định lượng của các chuyên gia phòng thí nghiệm, EU đã công bố “Council directive 96/23/EU in 1996” [12], trong đó quy định rõ hàm lượng kháng sinh theo từng loại thực phẩm và từng loại thuốc, ví dụ như với Enrofloxacin trong cơ, gan, thận của bò, lợn, gia cầm (gà, vịt) là 30 µg/kg; trong sữa bò là 100 µg/kg; Ở châu Âu, Hoa kỳ và các nước Bắc Mỹ đã cấm sử dụng kháng sinh họ Fluoroquinolon.

Tồn dư kháng sinh trong thực phẩm ảnh hưởng xấu đến sức khỏe cộng đồng và môi trường. Đây là một trong những nguyên nhân gây nên các bệnh nan y, tăng nguy cơ dị ứng, tăng khả năng xuất hiện các nguồn gen kháng thuốc ở các chủng vi

sinh vật gây bệnh . Việc tồn dư kháng sinh trong thực phẩm (thịt, thủy hải sản , trứng, sữa,...) là rất phổ biến ở nước ta . Tình trạng trên không chỉ gây thiệt hại lớn về kinh tế mà quan trọng hơn là ảnh hưởng đến uy tín các sản phẩm nông nghiệp nước ta, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người và môi trường.

Đã nhiều phương pháp phân tích được nghiên cứu nhằm phát hiện dư lượng kháng sinh Fluoroquilone trong thực phẩm như HPLC, LC-MS, GC-MS, ... với độ chính xác cao, bên cạnh các đặc điểm ưu việt, phương pháp trên yêu cầu cao về thiết bị, hóa chất, trình độ sử dụng. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) là phương pháp miễn dịch dựa trên phản ứng đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể đã có ứng dụng nhiều trong xác định dư lượng kháng sinh trong thực phẩm, môi trường, y học...

Mục đích của nghiên cứu này là dựa trên các kết quả nghiên cứu đã có chúng tôi xây dựng phương pháp ELISA gián tiếp xác định dư lượng kháng sinh Levofloxacin trong sữa ở điều kiện phòng thí nghiệm.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN VỀ TÀI LIỆU

1.1. Kháng sinh nhóm Fluoroquilone

1.1.1. Nguồn gốc và sự phát triển của kháng sinh nhóm Fluoroquilone

Quinolone (Flumequin, Norfloxacin, Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Difloxacin, Marbofloxacin, Ofloxacin...) là nhóm kháng sinh nhân tạo gồm những dẫn xuất của quinolein. Quinolone đầu tiên (acid nalidixic) có phổ kháng khuẩn hẹp (tác dụng trên vi khuẩn Gram âm). Kháng sinh đầu tiên trong nhóm là acid nalidixic được phát hiện vào năm 1962, được phân lập như một tạp chất trong sản xuất quinine sau đó một loạt các quinolon thế hệ I được tổng hợp như cinoxacin, oxolinic, piperimidic... Trong cấu trúc không gian không có nhân piperidin và không có nguyên tử Flour. Quinolone thế hệ I có phổ tác dụng hẹp, chỉ tác dụng trên vi khuẩn gram âm (trừ *Pseudomonas aeruginosa*) [1,10]. Hiện nay quinolon thế hệ I nhanh chóng bị kháng thuốc nên hạn chế được sử dụng [11].

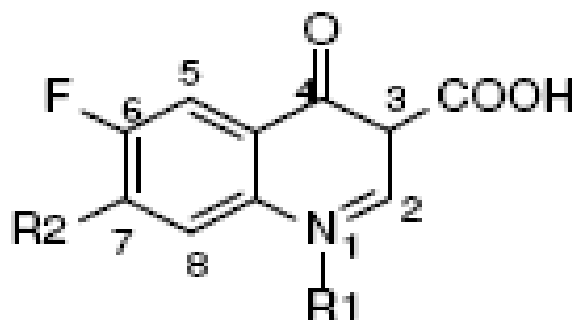
Quinolone được fluor hóa gọi là Fluoroquinolone đã được đưa vào sử dụng trong lâm sàng vào những năm 1970. Fluoroquinolone có phổ kháng khuẩn rộng, tác dụng trên cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Kháng sinh nhóm này phân bố đồng đều cả trong dịch nội và ngoại bào, phân bố hầu hết các cơ quan: Phổi, gan, mật, xương, tiền liệt tuyến, tử cung, dịch não tủy... và qua được hàng rào nhau thai. Fluoroquinolone bài thải chủ yếu qua đường tiết niệu ở dạng còn nguyên hoạt chất và tái hấp thu thụ động ở thận.[1,2,10] do vậy nhóm Fluoroquilone được sử dụng trong y học, chăn nuôi thú y, thủy sản...[10,11].

1.1.2. Phân loại và cơ chế tác dụng

Fluoroquilone là gốc thuốc kháng sinh hiệu quả, phổ rộng được sử dụng nhiều và phổ biến cả ở người và động vật (*trong chăn nuôi gia súc, gia cầm và thủy sản...*). Tuy nhiên tác dụng phụ của chúng đã được xác nhận. Sử dụng quá liều và

tồn dư các gốc thuốc này trong thực phẩm là vấn đề không chỉ ở nước ta mà còn ở nhiều nước trên thế giới.

Fluroquinolone là một trong những nhóm kháng sinh tổng hợp hoá học có khả năng khuếch tán tốt trong mô bào, nhanh chóng ức chế và tiêu diệt vi khuẩn thông qua sự ức chế tổng hợp ADN (Brown, 1996) do đó được sử dụng phổ biến và hiệu quả trong thú y. Tuy nhiên, việc sử dụng nhóm kháng sinh này trong chăn nuôi thú y và thủy sản có tác dụng xấu đến môi trường và sức khỏe cộng đồng (WHO, 1998). Nhóm Fluroquinolones được sử dụng trong thú y gồm các loại sau: Danofloxacin (*Advocin, Advocid*), Difloxacin (*Dicural, Vetequinon*), Enrofloxacin (*Baytril*), Ibafoxacin (*Ibafilin*), Marbofloxacin (*Marbocyl, Zenequin*), Orbifloxacin (*Orbax, Victas*), Sarafloxacin (*Floxasol, Saraflox, Sarafin*).



Hình 1. Cấu trúc phân tử gốc Fluoroquinolone

Công thức cấu tạo chung của nhóm quinolone là hợp chất vòng thơm có chứa N, vị trí thứ 4 có gắn nhóm ketone, vị trí thứ 3 có gắn nhóm carboxylic. Các dẫn xuất của quinolone gồm những hợp chất mà: Vị trí: Có gắn thêm nhóm alkyl hoặc aryl; Vị trí 6: Có thể gắn thêm F; vị trí 2,6,8 có thể gắn thêm một nguyên tử N [15].

Cơ chế tác động của Fluoroquinolone là ức chế tổng hợp acid nucleic. Gốc quinolone (acid nalidixic và các Fluoroquinolone) ức chế mạnh sự tổng hợp DNA trong giai đoạn nhân đôi do ức chế enzyme DNA gyrase. Cơ chế tác động này hiệu quả trên cả vi khuẩn gram dương và gram âm. Các quinolon đều ức chế tổng hợp AND - gyrase, là enzym mở vòng xoắn AND, giúp cho sự sao chép và phiên mã, vì