

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TP.HCM
TRUNG TÂM THÔNG TIN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



BÁO CÁO PHÂN TÍCH XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ

Chuyên đề:

**XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ PHÁT HIỆN DƯ LƯỢNG
KHÁNG SINH TRONG THỦY SẢN – PHƯƠNG PHÁP
PHÁT HIỆN NHANH**



Biên soạn: Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ TP. HCM

Với sự cộng tác của:

- **GS.TS. Chu Phạm Ngọc Sơn**
Chủ tịch HĐQT, Công ty Sắc ký Hải Đăng
- **TS. Phan Văn Tiến**
Trung tâm Nghiên cứu triển khai, Khu Công nghệ cao TP.HCM
- **ThS. Bùi Quốc Anh**
Trung tâm Nghiên cứu triển khai, Khu Công nghệ cao TP.HCM

TP.Hồ Chí Minh, 04/2014

MỤC LỤC

I. TÌNH HÌNH NHIỆM KHÁNG SINH TRONG THỦY SẢN XUẤT KHẨU CỦA VIỆT NAM TRONG NHỮNG NĂM GẦN ĐÂY	4
1. Thành tựu xuất khẩu thủy sản trong những năm gần đây	4
2. Tình hình nhiệm kháng sinh trong xuất khẩu thủy sản giai đoạn từ 2011-2014.....	8
II. XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ PHÂN TÍCH DƯ LƯỢNG KHÁNG SINH TRONG THỦY SẢN VÀ THỰC PHẨM TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ	11
1. Tình hình đăng ký sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm theo thời gian.....	11
2. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm ở các quốc gia.....	13
3. Các hướng nghiên cứu được quan tâm nhiều về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản, thực phẩm theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC.....	15
4. Nhận xét	19
III. PHÂN TÍCH THUỐC THÚ Y THỦY SẢN BẰNG KỸ THUẬT LC-MS/MS – THUẬN LỢI VÀ KHÓ KHĂN	20
1. Sử dụng hóa chất, kháng sinh trong sản xuất kinh doanh thủy sản.....	20
2. Kiểm định thuốc thú y trong thực phẩm	25
3. Những thuận lợi về thiết bị phân tích.....	27
3.1. Thiết bị sắc ký lỏng siêu nhanh UPLC	27
3.2. Cải tiến đầu dò khối phổ:.....	29
4. Nhận danh và định lượng những chất không biết có trong nền mẫu	31
5. Một số thí dụ về phân tích thuốc thú y tại công ty dịch vụ KH&CN Sắc Ký Hải Đăng.....	33
5.1. Phân tích tại Công ty EDC-HD Chloramphenicol trong thủy sản mua trong các chợ và siêu thị TP Hồ Chí Minh	33
5.2. Phân tích Nitrofurans trong tôm tại công ty EDC- HD	37
IV. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM DỰA TRÊN MIỄN DỊCH.....	43
1. Phương pháp phân tích không cạnh tranh	43
2. Phương pháp phân tích có cạnh tranh	43
3. Các dạng đánh dấu	44
3.1. Đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ	44
3.2. Đánh dấu bằng enzyme	45
3.3. Đánh dấu phát quang hoá học.....	45

3.4. Đánh dấu huỳnh quang	45
4. Ưu và nhược điểm của các phương pháp xét nghiệm dựa trên miễn dịch	46
4.1. Ưu điểm	46
4.2. Nhược điểm.....	46
V. QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ENROFLOXACIN TRONG THỰC PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA CẠNH TRANH TRỰC TIẾP	47
1. Khái niệm về ELISA	47
1.1. Phân loại ELISA	47
1.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến độ nhạy của phản ứng ELISA	54
1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả ELISA.....	54
2. Quy trình phân tích Enrofloxacin bằng phương pháp ELISA cạnh tranh trực tiếp	55
2.1. Nguyên lý.....	55
2.2. Các bước tiến hành.....	56
TÀI LIỆU THAM KHẢO	60

XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ PHÁT HIỆN DƯ LƯỢNG KHÁNG SINH TRONG THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN NHANH

I. TÌNH HÌNH NHIỆM KHÁNG SINH TRONG THỦY SẢN XUẤT KHẨU CỦA VIỆT NAM TRONG NHỮNG NĂM GẦN ĐÂY

1. Thành tựu xuất khẩu thủy sản trong những năm gần đây:

Ngày 1/4/1959, Chủ tịch Hồ Chí Minh thăm làng cá Cát Bà (TP Hải Phòng). Để ghi nhớ sự kiện này, ngày 18/3/1995, Thủ tướng Chính phủ quyết định lấy ngày 1/4 hằng năm là Ngày truyền thống Ngành Thủy sản Việt Nam. 55 năm xây dựng và phát triển, nghề cá Việt Nam đã có những bước tiến vượt bậc, góp phần quan trọng phát triển kinh tế - xã hội đất nước, với quy mô ngày càng sâu rộng, chiếm vị trí quan trọng trong nền kinh tế quốc dân.

Diện tích nuôi thủy sản tăng đều qua từng năm, từ gần 500.000 ha (1990) đến nay đã hơn 1 triệu ha; sản lượng nuôi trồng tăng từ 23% (1990) lên hơn 54% (2013), với hai sản phẩm chủ lực tôm và cá tra.

Việt Nam hiện có 567 nhà máy chế biến thủy sản quy mô công nghiệp đang đáp ứng các tiêu chuẩn an toàn thực phẩm như HACCP, GMP, SSOP; hơn 400 nhà máy đông lạnh có công suất 7.500 tấn; 415 nhà máy đủ tiêu chuẩn xuất khẩu sang EU, tăng 398 nhà máy so với năm 1999; và nhiều nhà máy, vùng nuôi đạt chứng nhận tự nguyện như GlobalGAP, ASC, BAP, BRC...

Đến nay, sản phẩm thủy sản Việt Nam vươn tới hơn 170 thị trường, trong đó những thị trường chính là EU, Mỹ, Nhật, Úc; kim ngạch xuất khẩu năm 2013 đạt hơn 6,7 tỷ USD, gấp hơn 32 lần so năm 1990, trở thành một trong những nước xuất khẩu thủy sản lớn trên thế giới.

❖ 10 thị trường nhập khẩu thủy sản lớn của Việt Nam năm 2013:

Mỹ:

Với giá trị nhập khẩu thủy sản 11 tháng năm 2013 đạt 1.382,865 triệu USD, tăng 23,8% so với cùng kỳ 2012, Mỹ chiếm 22,2% tổng giá trị xuất khẩu thủy sản Việt Nam. Là thị trường đứng đầu về tôm (đạt 748,571 triệu USD, tăng 75,7%), cá tra (đạt 351,313 triệu USD, tăng 4,6%), cá ngừ (đạt 177,623 triệu USD, giảm 23,5%)... của Việt Nam. Tuy nhiên, năm 2013, Mỹ cũng là thị trường có nhiều "rắc rối" nhất với cả tôm và cá tra Việt Nam.

EU:

Năm 2013, giá trị nhập khẩu thủy sản Việt Nam vào thị trường này đã tăng 2,88% so cùng kỳ, với 1.074,458 triệu USD. Hiện nay, EU chiếm 17,2% tổng giá trị xuất khẩu thủy sản Việt Nam. Các sản phẩm chính như: tôm (369,566 triệu USD, tăng 28,9%), cá tra (353,657 triệu USD, giảm 9,7%), cá ngừ (126,252 triệu USD, tăng 24,8%)... Đặc biệt, EU là thị trường nhập khẩu nhuyễn thể hai mảnh vỏ lớn nhất của Việt Nam, chiếm 69,4% tổng giá trị xuất khẩu, với 11 tháng đầu năm đạt 46,185 triệu USD, giảm 2,1% so với cùng kỳ.

Nhật Bản:

Với giá trị nhập khẩu đạt 1.048,563 triệu USD, tăng 3,4% so với cùng kỳ, thị trường Nhật Bản chiếm 16,8% tổng giá trị xuất khẩu thủy sản Việt Nam. Là thị trường tiêu thụ tôm (645,938 triệu USD, tăng 12,9%), mực, bạch tuộc (110,498 triệu USD, giảm 17,5%) lớn thứ hai và cá ngừ (40,219 triệu USD, giảm 20,1%), mực, bạch tuộc (110,498 triệu USD, giảm 17,5%), nhuyễn thể hai mảnh vỏ (7,323 triệu USD, tăng 4,7%) lớn thứ ba của Việt Nam... Tuy nhiên, rào cản Ethoxyquin đối với mặt hàng tôm khiến cho xuất khẩu tôm sang thị trường này không mấy khởi sắc.

Trung Quốc và Hồng Kông:

Giá trị nhập khẩu đạt 518,851 triệu USD, tăng 39,1% so với cùng kỳ, chiếm 8,3% tổng giá trị xuất khẩu thủy sản Việt Nam. Trung Quốc là một trong những thị trường tiềm năng của thủy sản Việt Nam với số lượng lớn và đa dạng: tôm (349,290 triệu USD, tăng 53,6%), cá tra (82,764 triệu USD, tăng 25,6%)... Đây là thị trường có tốc độ tăng nhập khẩu mạnh nhất từ Việt Nam, liên tục với tỷ lệ 2 con số. Năm 2013, trung bình mỗi tháng xuất khẩu thủy sản Việt Nam sang Trung Quốc đạt gần 45 triệu USD, riêng mặt hàng tôm đã đạt tới gần 28 triệu USD/tháng, chiếm tới 68% tổng giá trị xuất khẩu thủy sản Việt Nam.

Hàn Quốc:

11 tháng, giá trị nhập khẩu thủy sản Việt Nam đạt 454,871 triệu USD, giảm 1,8% so với cùng kỳ. Hàn Quốc là thị trường tiêu thụ mặt hàng mực, bạch tuộc, chả cá và surimi lớn nhất của Việt Nam. Tuy nhiên năm nay, các mặt hàng này có xu hướng chững lại và sụt giảm. 11 tháng năm 2013, giá trị xuất khẩu mực, bạch tuộc đạt 123,339 triệu USD, giảm 8,1%; chả cá và surimi đạt 81,557 triệu tấn, giảm 20,2% so với cùng kỳ. Tháng 12/2012, Hàn Quốc thông báo kiểm tra Ethoxyquin trong tôm nhập khẩu từ Việt Nam giới hạn là 0,01 ppm. Tuy nhiên, xuất khẩu tôm của Việt Nam sang thị trường này vẫn đạt 189,158 triệu USD, tăng 22,6%.

ASEAN:

11 tháng năm 2013, giá trị nhập khẩu thủy sản Việt Nam của các nước ASEAN đạt 355,792 triệu USD, tăng 12,4% so với cùng kỳ, chiếm 5,7% tổng giá trị xuất khẩu thủy sản Việt Nam. Với các sản phẩm chính như: tôm (369,566 triệu USD, tăng 38,0%), cá tra (114,206 triệu USD, tăng 12,9%), cá ngừ (33,194 triệu USD, giảm 4,6%)... Thái Lan, Singapore hiện là những thị trường lớn nhất trong khối về nhập khẩu thủy sản (đặc biệt là sản phẩm surimi).

Australia:

Hàng năm, Australia nhập khẩu 200.000 tấn thủy sản, trị giá khoảng 1 tỷ USD, trong đó Việt Nam là nhà cung cấp lớn thứ ba sau New Zealand và Trung Quốc. Theo Hiệp hội Nhập khẩu Thủy sản Australia (SIAA), tôm là mặt hàng thủy sản Việt Nam nhập khẩu nhiều nhất vào Australia. 11 tháng năm 2013, giá trị nhập khẩu thủy sản Việt Nam đạt 188,212 triệu USD, tăng 7,9% so với cùng kỳ; trong đó, tôm là chủ yếu, đạt 117,533 triệu USD, tăng 20,5%.

Brazil:

11 tháng năm 2013, giá trị nhập khẩu thủy sản Việt Nam của Brazil đạt 107,185 triệu USD, tăng 57,2% so với cùng kỳ. Trong đó, cá tra là mặt hàng chính với 106,042 triệu USD, tăng 56,0%. Brazil là thị trường nhập khẩu cá tra lớn thứ tư của Việt Nam, sau Mỹ, EU và ASEAN. Tuy nhiên, theo các doanh nghiệp, giá xuất khẩu cá tra sang thị trường này năm 2013 khoảng 1,9 - 2,2 USD/kg, thấp hơn 0,3 USD/kg so với năm 2012.

Mexico:

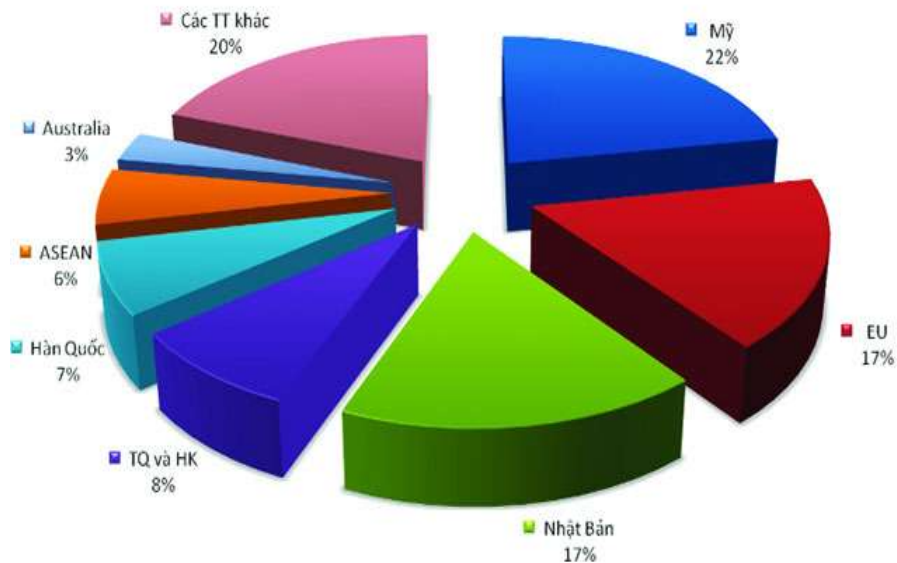
Giá trị nhập khẩu thủy sản Việt Nam đạt 95,651 triệu USD, giảm 3,0% so với cùng kỳ. Cá tra vẫn là sản phẩm chính của thủy sản Việt Nam ở thị trường này, 11 tháng năm 2013 đạt 87,056 triệu USD, giảm 3,6%. Nhập khẩu cá tra của Mexico thời gian gần đây sụt giảm là do sản lượng cá rô phi sản xuất của nước này hiện đang dồi dào, giá khá ổn định nên người dân chuyển sang tiêu thụ sản phẩm này nhiều hơn. Trong khi có, nhập khẩu cá ngừ của nước này lại tăng 3,3%, đạt 6,641 triệu USD.

Nga:

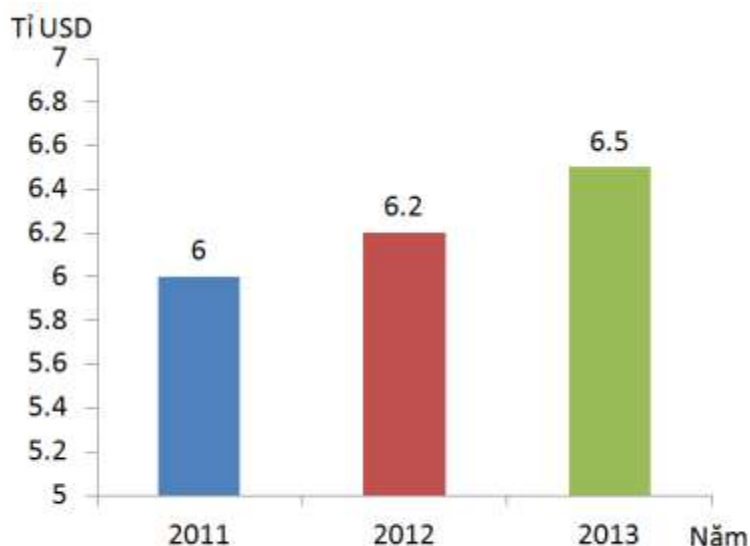
11 tháng đầu năm 2013, giá trị nhập khẩu thủy sản Việt Nam của Nga đạt 86,246 triệu USD, giảm 2,9% so với cùng kỳ. Con số này chưa thật sự gây ấn tượng nhưng lại mở ra một cơ hội mới trong nỗ lực chinh phục thị trường Nga, một thị trường tiềm năng của châu Âu. Về sản phẩm xuất khẩu vào Nga, cá tra và basa vẫn là mặt hàng

chủ yếu, trong đó, các sản phẩm chế biến từ cá tra và basa là fillet tươi ướp lạnh và fillet khác cũng chiếm tỷ trọng cao.

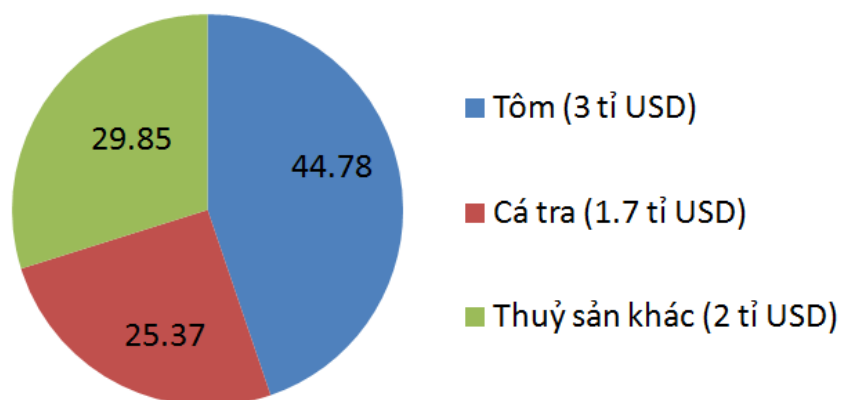
**Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam 11 tháng đầu năm 2013
(GT)**



Tuy đạt được những thành tựu nhất định, xuất khẩu Việt Nam cũng gặp không ít khó khăn. Từ việc cạnh tranh của những nước xuất khẩu thủy sản khác đến vấn đề an toàn thực phẩm trong xuất khẩu thủy sản. Trong đó, việc sử dụng kháng sinh bừa bãi, mất kiểm soát trong khâu nuôi trồng đã làm mất uy tín trầm trọng của thủy sản Việt Nam trên thị trường thế giới. Theo kết quả báo cáo của Tổ chức Phát triển Công nghiệp của Liên Hợp Quốc (UNIDO) ở 4 thị trường lớn là EU, Hoa Kỳ, Nhật Bản, Úc thì Việt Nam là một trong ba nước đứng đầu về số vụ bị từ chối nhập khẩu sản phẩm thủy sản giai đoạn 2006-2010 cao hơn so với các nước nhập khẩu khác. Tính trung bình từ 2006-2010, Mỗi năm Việt Nam thiệt hại hơn 14 triệu USD do hàng xuất khẩu thủy sản bị trả lại (Chiếm 0.39% doanh thu trung bình từ 2006-2010 là 3.2 tỉ USD). Sau đây là tóm tắt sơ lược tình hình nhiễm kháng sinh trong thủy sản xuất khẩu từ 2011-2013



Doanh thu xuất khẩu thủy sản từ năm 2011-2013



Cơ cấu doanh thu xuất khẩu thủy sản Việt Nam năm 2013

2. Tình hình nhiễm kháng sinh trong xuất khẩu thủy sản giai đoạn từ 2011-2014

Năm 2011:

Mức độ và số lượng lô hàng bị nước ngoài cảnh báo năm 2011 không có dấu hiệu giảm trong bối cảnh Cục NAFIQAD đã áp dụng các biện pháp kiểm soát tăng cường nhằm vào thành phẩm trước xuất khẩu, đặc biệt là hơn một nửa số cảnh báo do lây nhiễm kháng sinh cầm cố nguồn gốc từ khâu nuôi trồng, nhất là tôm. Điều đáng lưu ý là các cảnh báo nhiễm kháng sinh của nước ngoài có cả các loại kháng sinh đã bị cấm sử dụng trong nuôi trồng từ trước đó như *Chloramphenicol*, *Trifluralin*. Việc cho phép sử dụng một số loại kháng sinh trong NTTS, kiểm soát không tốt việc sản xuất,

lưu thông các chất đã bị cấm và thiếu kiểm soát đồng đều của Nhà nước trên “chuỗi sản xuất”, nhưng doanh nghiệp lại là chủ thể phải chịu sự trừng phạt (xử lý vi phạm) khi bị phát hiện cảnh báo trong bối cảnh đã tuân thủ đầy đủ theo yêu cầu lấy mẫu kiểm nghiệm & cấp Chứng thư của Cục NAFIQAD. Điều này không chỉ mất công bằng, mà còn đặt ra một câu hỏi lớn về tính hiệu quả của biện pháp kiểm soát ATTP kháng sinh cần phải được xem lại.

Nhìn vào một thực tế ở các lô hàng thủy sản xuất khẩu sang Nhật. Trong năm 2011, có 140 lô hàng thủy sản xuất khẩu đi Nhật bị cơ quan có thẩm quyền của Nhật cảnh báo, trong đó có đến 106 lô hàng (tương đương 75,7 %) phát hiện nhiễm kháng sinh (bao gồm cả trifluralin) và 26 lô hàng bị cảnh báo do các chỉ tiêu khác như vi sinh, tạp chất (tương đương 24,3%). Trong thực tế hiện nay, các nhà máy đều không sử dụng kháng sinh hoặc trifluralin trong quá trình chế biến mà nguyên nhân gây nhiễm các chỉ tiêu này đều đến từ khâu trước chế biến (nuôi trồng, khai thác, thu gom nguyên liệu). Như vậy, chỉ 1/4 các lô hàng thủy sản xuất khẩu sang Nhật bị cảnh báo có nguy cơ xuất phát từ các nhà máy và đến 3/4 các lô hàng bị cảnh báo là do các nguyên nhân nằm ngoài tầm kiểm soát của doanh nghiệp. Các doanh nghiệp chế biến hiện nay chỉ có thể kiểm soát nguyên liệu đầu vào bằng cách lấy mẫu ngẫu nhiên để kiểm nghiệm chứ hoàn toàn không thể kiểm tra kháng sinh 100% nguyên liệu. Và doanh nghiệp dù có muốn cũng không thể kiểm tra toàn bộ quá trình nuôi cũng như kiểm soát việc sử dụng kháng sinh, hóa chất tại các cơ sở cung ứng nguyên liệu trước khi nhập nguyên liệu chế biến.

Năm 2012

Theo Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm sản và Thủy sản (NAFIQAD), trong năm 2012, nhiều lô hàng thủy sản xuất khẩu của Việt Nam vẫn liên tục bị cơ quan thẩm quyền ở nhiều nước nhập khẩu cảnh báo không bảo đảm an toàn thực phẩm.

Số liệu thống kê tại các thị trường có yêu cầu kiểm tra, chứng nhận của Cục cho thấy tỷ lệ lô hàng bị cảnh báo vi phạm quy định về an toàn thực phẩm trong năm 2012 là 0,48%, tăng 0,02% so với năm 2011. Trong khi đó, đối với các thị trường không yêu cầu kiểm tra, chứng nhận của Cục, tình hình cảnh báo cũng rất nghiêm trọng, cụ thể: Cục mới nhận được văn bản của Cơ quan Thanh tra thực phẩm Canada (CFIA) và Bộ Nông lâm ngư nghiệp Australia (DAFF) thông báo tình hình phát hiện dư lượng Fluoroquinolones trong các lô hàng thủy sản của Việt Nam tăng cao, cụ thể như sau:

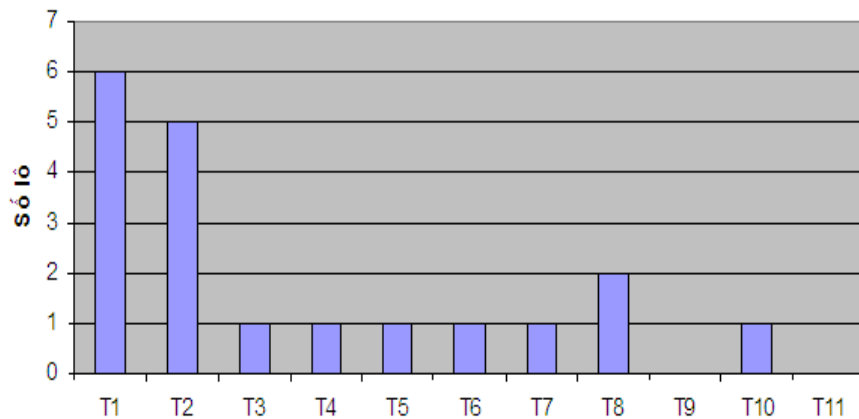
- **Thị trường Canada:** CFIA thông báo tình hình vi phạm do phát hiện dư lượng Fluoroquinolones trong các lô hàng thủy sản nuôi của Việt Nam từ năm 2009 đến nay không có sự cải thiện. Theo đó, kết quả kiểm tra dư lượng Fluoroquinolones đối với lô

hàng thủy sản nhập khẩu do CFIA thực hiện trong 03 năm qua cho thấy tỉ lệ đáp ứng yêu cầu của Việt Nam ở mức rất thấp so với các nước khác (tỉ lệ đáp ứng của Việt Nam trong các năm 2009-2010, 2010-2011, 2011-2012 chỉ là 72.88%, 59.68%, 64.04%, thấp hơn nhiều so với con số 95%, 96.3%, 95.7% của các nước khác xuất khẩu thủy sản vào Canada). Riêng trong năm 2011-2012, Việt Nam đã có 103 lô hàng thủy sản bị từ chối nhập khẩu vào Canada do phát hiện dư lượng Fluoroquinolones.

- **Thị trường Australia:** DAFF thông báo đã phát hiện 39 lô hàng thủy sản Việt Nam nhiễm dư lượng Fluoroquinolones trong thời gian vừa qua (chủ yếu là enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin trong cá fillet).

- **Thị trường Nhật Bản:** trong năm 2012, số lô hàng tôm xuất khẩu từ Việt Nam nhiễm enrofloxacin là 19 (thấp hơn số lô hàng bị nhiễm trong năm 2011 là 57 lô).

Cảnh báo tôm nhiễm Enrofloxacin sang Nhật Bản, năm 2012



Năm 2013

Theo báo cáo tổng kết công tác quản lý chất lượng an toàn thực phẩm nông lâm thủy sản 2013 của NAFIQAD, Số lượng các lô hàng thủy sản Việt Nam xuất khẩu năm 2013 bị các thị trường nước ngoài cảnh báo là 185 lô, chiếm 0.29% tổng số lô hàng xuất khẩu, tăng so với năm 2012 (0.26%). Trong đó có 85 lô bị cảnh báo dư lượng hoá chất, kháng sinh cấm/hạn chế sử dụng (46%)

Những tháng đầu năm 2014

Trong thời gian qua, Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm sản và Thủy sản (NAFIQAD) liên tiếp nhận được cảnh báo của Cơ quan thẩm quyền EU và Nhật Bản về việc phát hiện dư lượng Oxytetracycline vượt mức giới hạn cho phép trong các lô hàng tôm nuôi của Việt Nam xuất khẩu sang 2 thị trường này.

Với thị trường Nhật Bản, từ ngày 14/3/2014, thời điểm Nhật Bản áp dụng chế độ kiểm tra Oxytetracycline đối với 100% lô hàng tôm nuôi của Việt Nam do phát hiện dư lượng chất này trong 02 lô hàng tôm nuôi, đến nay, đã có thêm 04 lô hàng tôm nuôi của Việt Nam xuất khẩu sang thị trường này bị cảnh báo chỉ tiêu Oxytetracycline, nâng tổng số lô hàng tôm nuôi và sản phẩm từ tôm nuôi bị cảnh báo ở thị trường Nhật Bản lên 06 lô hàng (*Mức giới hạn tối đa cho phép đối với Oxytetracycline được Nhật Bản áp dụng là 0,2ppm*).

Trong khi đó, từ đầu năm 2014 đến nay EU đã cảnh báo 05 lô hàng tôm nhập khẩu từ Việt Nam, gấp 2,5 lần tổng số lô hàng thủy sản nuôi xuất khẩu của Việt Nam bị cảnh báo ở thị trường này trong cả năm 2013 (2 lô) (*Mức giới hạn tối đa cho phép đối với Oxytetracycline được EU áp dụng tương đương với Việt Nam là 0,1ppm*).

Mặc dù Oxytetracycline là kháng sinh được phép sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, nhưng việc tôm nuôi của Việt Nam bị cảnh báo Oxytetracycline ở cả hai thị trường xuất khẩu lớn của Việt Nam (Nhật Bản và EU) cho thấy có tình trạng lạm dụng Oxytetracycline trong quá trình nuôi và không tuân thủ việc ngừng sử dụng thuốc trước khi thu hoạch theo quy định.

Thủy sản Việt Nam đang đứng trước nguy cơ bị tạm ngưng nhập khẩu vào EU và Nhật Bản, nếu tình trạng nhiễm Oxytetracycline không có dấu hiệu suy giảm.

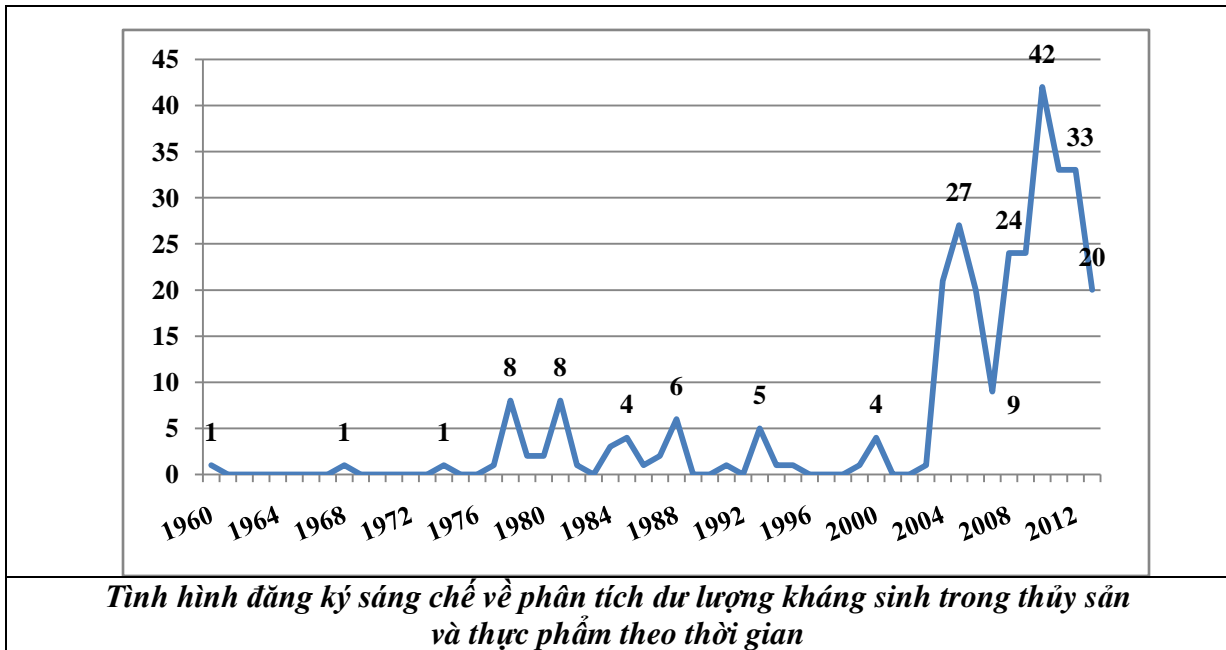
Tóm lại ngành nuôi trồng và xuất khẩu thủy sản của nước ta có rất nhiều thuận lợi để phát triển, nếu chúng ta có một chiến lược hợp lý trong việc kiểm soát dịch bệnh, sử dụng kháng sinh. Để làm được việc này, cần sự phối hợp chặt chẽ giữa người nuôi thủy sản, Hiệp hội các doanh nghiệp chế biến xuất khẩu thủy sản (VASEP), và Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm sản và Thủy sản. Hy vọng tương lai ngành thủy sản Việt Nam sẽ có những bước tiến vượt bậc và thành tựu to lớn hơn.

II. XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ PHÂN TÍCH DƯ LƯỢNG KHÁNG SINH TRONG THỦY SẢN VÀ THỰC PHẨM TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ

1. Tình hình đăng ký sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm theo thời gian

Theo nguồn CSDL Wipsglobal, đầu thập niên 60 bắt đầu có sáng chế đăng ký về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản, thực phẩm. Đây là sáng chế được đăng ký bảo hộ ở Mỹ, ngày nộp đơn đăng ký sáng chế: 26/04/1960.

Từ đó đến năm 2013 có khoảng 308 sáng chế đăng ký liên quan đến vấn đề này. Tình hình đăng ký sáng chế được biểu hiện ở đồ thị sau:

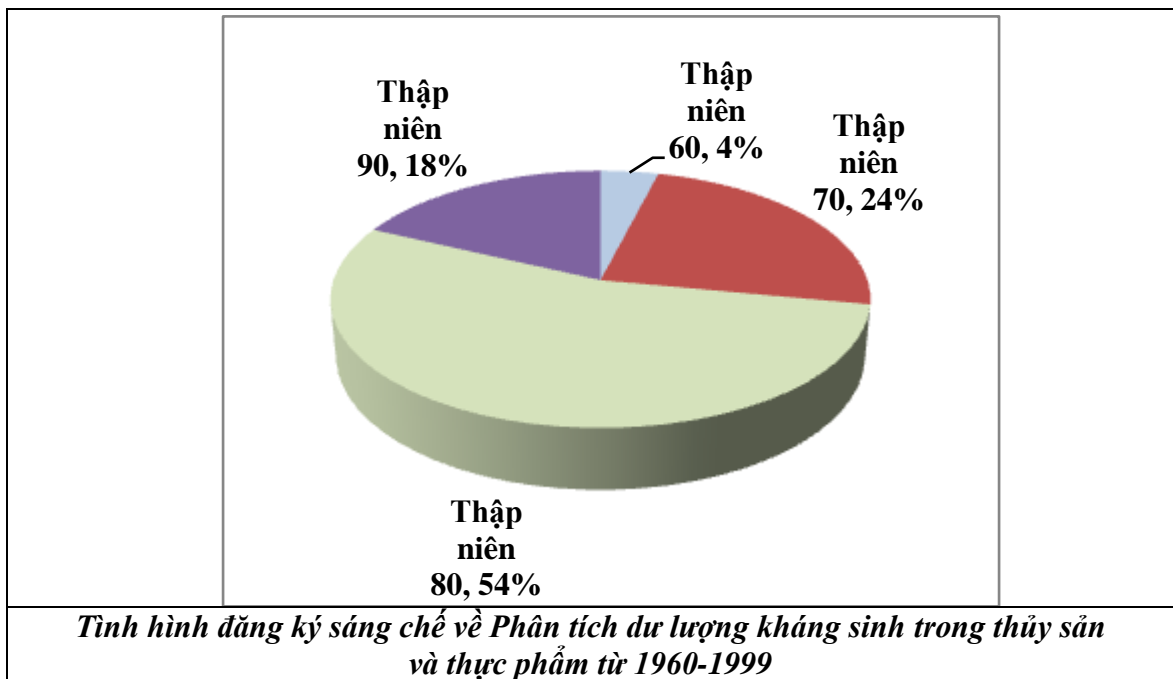


– Theo đồ thị biểu diễn, có thể thấy lượng sáng chế tập trung nhiều từ những năm 2000 cho đến nay, cụ thể như sau:

- ✓ Năm 1960-1999: 50 sáng chế
- ✓ Năm 2000-2013: 258 sáng chế

– **Giai đoạn 1960-1999:**

- ✓ Có 50 sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm được đăng ký bảo hộ ở 12 quốc gia trên toàn thế giới. Trong đó, lượng sáng chế tập trung đăng ký bảo hộ chủ yếu ở Mỹ (10 sáng chế).
- ✓ Từ 1960-1999: lượng sáng chế đăng ký bảo hộ tập trung nhiều vào thập niên 80 với 27 sáng chế, chiếm tỷ lệ 54% trên tổng lượng sáng chế đăng ký trong giai đoạn này.

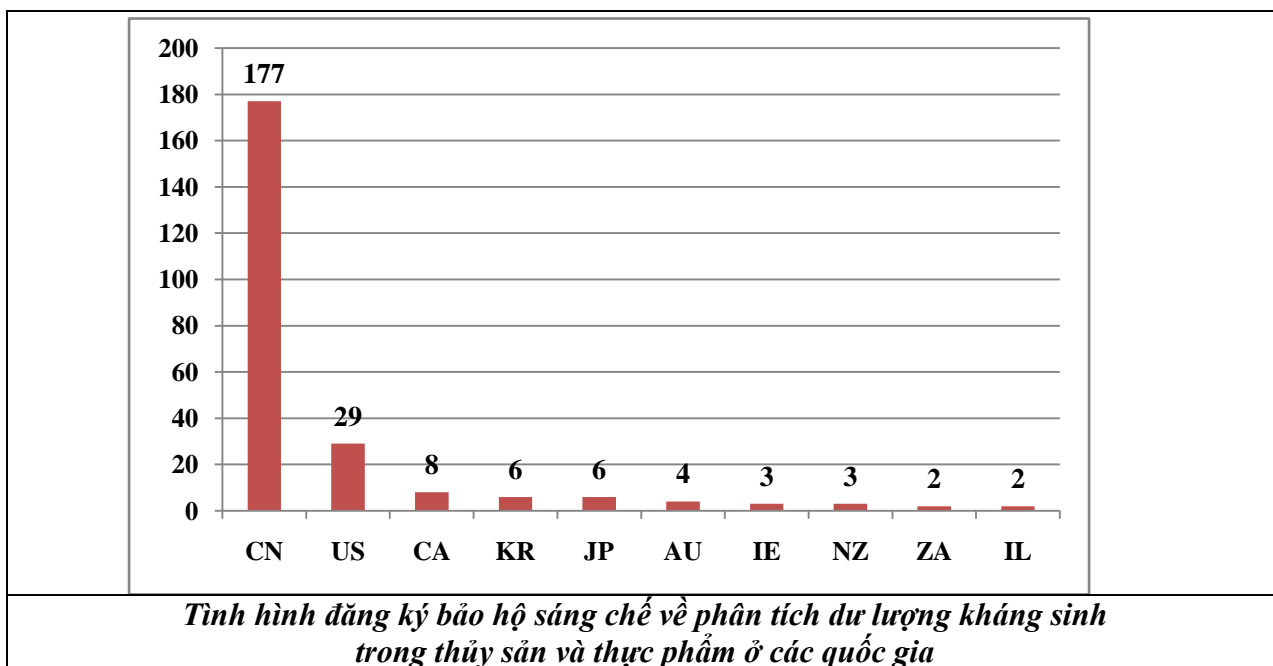


– Giai đoạn 2000-2013:

- ✓ Có 258 sáng chế về Phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm được đăng ký bảo hộ ở 13 quốc gia trên toàn thế giới. Trong đó, lượng sáng chế tập trung đăng ký bảo hộ chủ yếu ở Trung Quốc (177 sáng chế, chiếm tỷ lệ 69%). Trong giai đoạn này chỉ có 19 sáng chế đăng ký bảo hộ ở Mỹ, chiếm tỷ lệ 7%.
- ✓ Lượng sáng chế tập trung nhiều trong 2 năm: năm 2005 (27 sáng chế) và năm 2010 (42 sáng chế).

2. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm ở các quốc gia

– Hiện nay, sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm được đăng ký bảo hộ ở khoảng 17 quốc gia trên toàn thế giới và 2 tổ chức [WO - tổ chức thế giới (31SC), EP – tổ chức châu Âu (28SC)]. Trong đó, 10 quốc gia tập trung nhiều sáng chế đăng ký bảo hộ: Trung Quốc (CN): 177 SC, Mỹ (US): 29 SC, Canada (CA): 8 SC, Hàn Quốc (KR): 6 SC, Nhật Bản (JP): 6 SC, Úc (AU): 4 SC, Ireland (IE): 3 SC, New Zealand (NZ): 3 SC, Nam Phi (ZA): 2SC và Israel (IL): 2 SC.



– Trong 10 quốc gia tập trung nhiều sáng chế đăng ký bảo hộ, có sự xuất hiện của 3 quốc gia phát triển ở khu vực châu Á là: Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản. Lượng sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh đăng ký bảo hộ ở 3 quốc gia này chiếm 61% trên tổng lượng sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm.

– Theo bảng số liệu dưới đây, sáng chế đầu tiên về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm được đăng ký tại Mỹ (năm 1960). Đến năm 2003: mới có sáng chế đăng ký tại Trung Quốc. Tuy nhiên, cho đến nay, Trung Quốc đang là quốc gia tập trung nhiều sáng chế đăng ký bảo hộ nhất về việc Phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm nói chung.

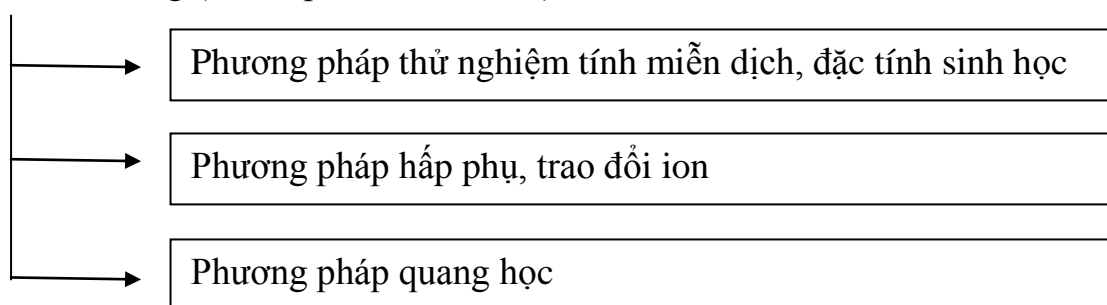
Nơi đăng ký bảo hộ	Năm sáng chế đầu tiên đăng ký
Mỹ	1960
Ireland	1974
Nam Phi	1977
Canada Nhật Bản New Zealand Israel	1978
Úc	1981

Hàn Quốc	1994
Trung Quốc	2003

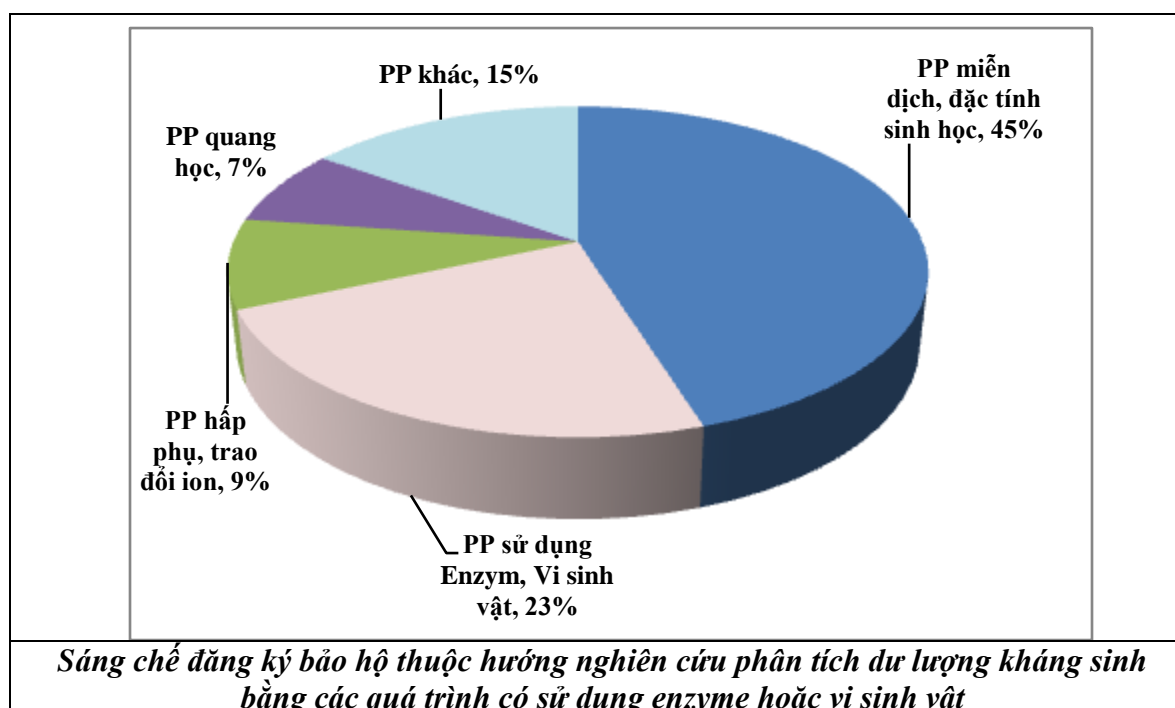
3. Các hướng nghiên cứu được quan tâm nhiều về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản, thực phẩm theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC

– Với 308 sáng chế về phía Trung tâm tiếp cận được, khi đưa vào bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC (International Patent Classification), nhận thấy 2 hướng nghiên cứu tập trung nhiều sáng chế đăng ký:

– Hướng nghiên cứu phân tích dư lượng kháng sinh bằng cách xác định hóa tính, lý tính của chúng (chỉ số phân loại G01N)

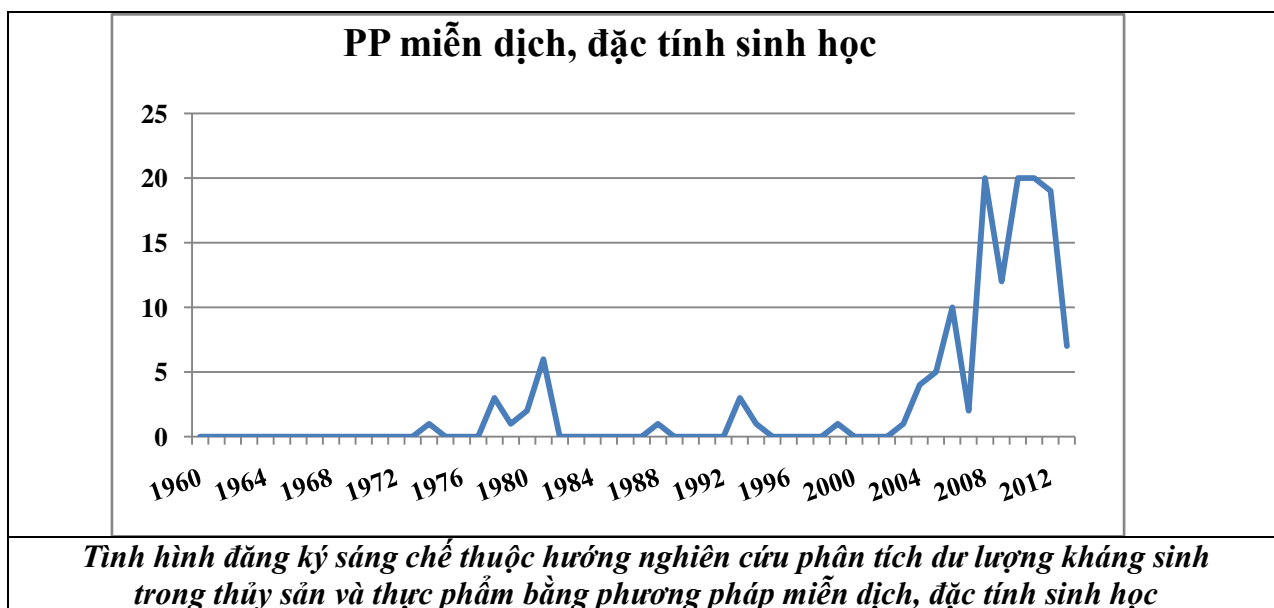


– Hướng nghiên cứu phân tích dư lượng kháng sinh bằng các quá trình có sử dụng enzyme hoặc vi sinh vật (chỉ số phân loại C12Q)



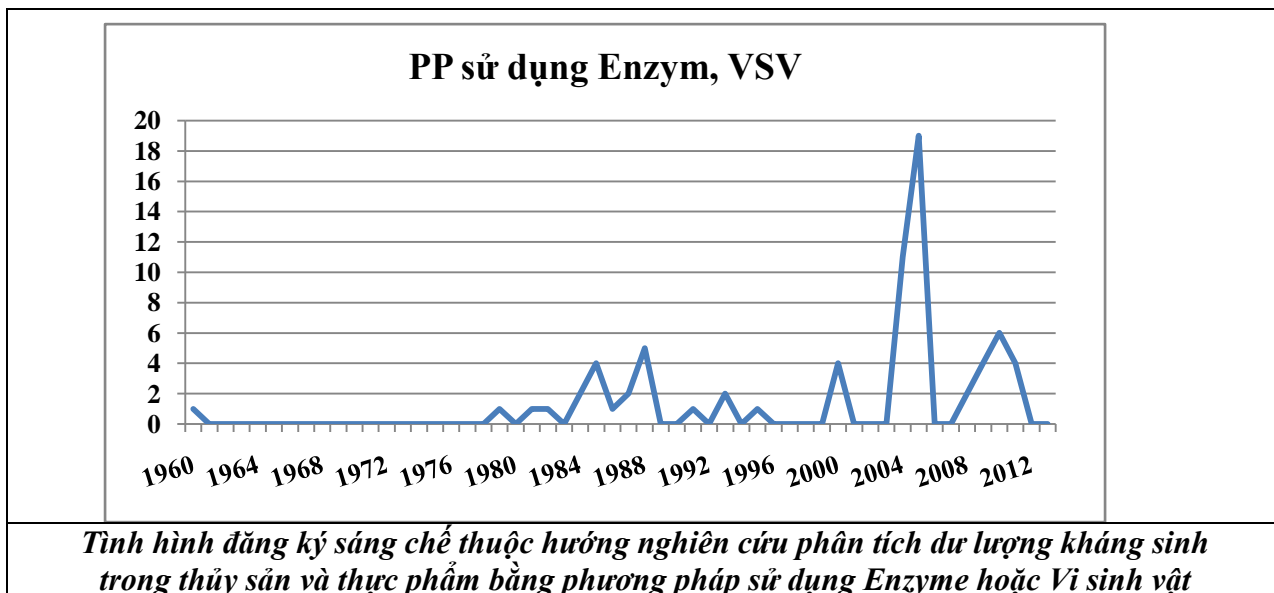
a. Hướng nghiên cứu phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm bằng phương pháp miễn dịch, đặc tính sinh học (chỉ số phân loại G01N-033): có 139 sáng chế, chiếm tỷ lệ 45% trên tổng lượng sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh. Sáng chế thuộc hướng nghiên cứu này tập trung vào việc sử dụng kháng thể đơn dòng, sự khuếch tán – di chuyển của kháng nguyên hoặc kháng thể.

– Sáng chế đầu tiên thuộc hướng nghiên cứu này được đăng ký vào năm 1974. Từ năm 2003, lượng sáng chế đăng ký bắt đầu tăng, tập trung nhiều nhất vào các năm 2008, 2010 và 2011.



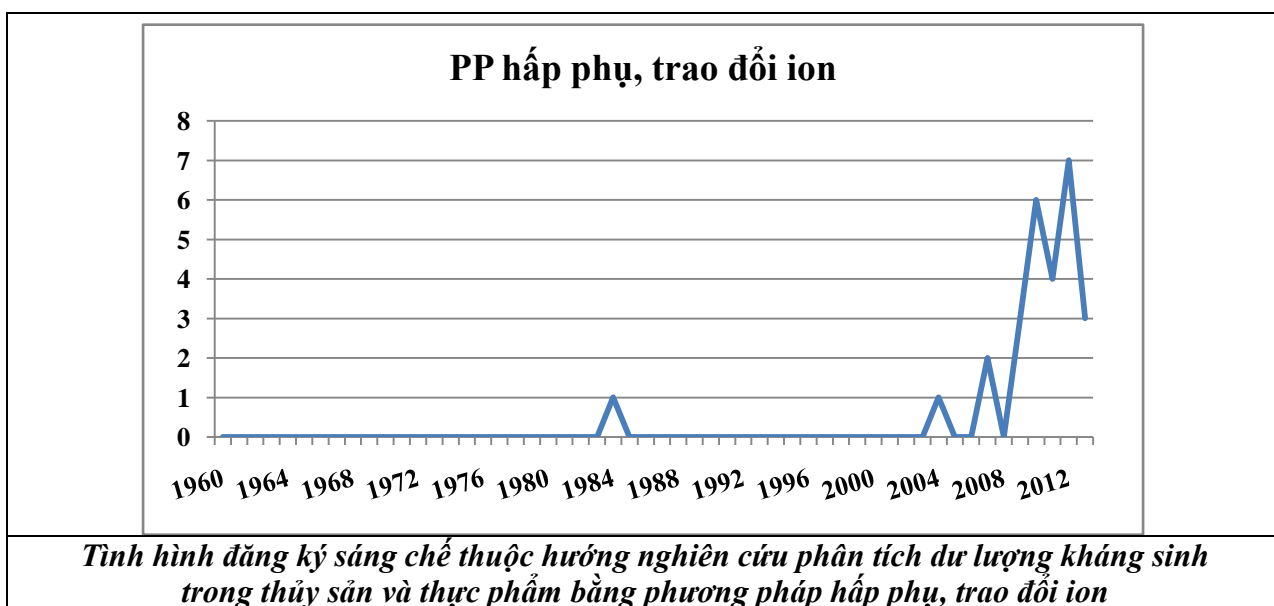
b. Hướng nghiên cứu phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm bằng phương pháp sử dụng Enzyme hoặc Vi sinh vật (chỉ số phân loại C12Q-001): có 72 sáng chế, chiếm tỷ lệ 23% trên tổng lượng sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh. Sáng chế thuộc hướng nghiên cứu này còn quan tâm tới các điều kiện phản ứng tối ưu trong các quá trình sử dụng Enzyme, vi sinh vật để phát hiện sự hiện diện của kháng sinh.

– Trong các hướng nghiên cứu, đây là hướng nghiên cứu đầu tiên có sáng chế đăng ký vào năm 1960. Theo thời gian, lượng sáng chế đăng ký có nhiều biến động, tăng giảm qua các năm, tập trung nhiều nhất vào năm 2005 (19 sáng chế).



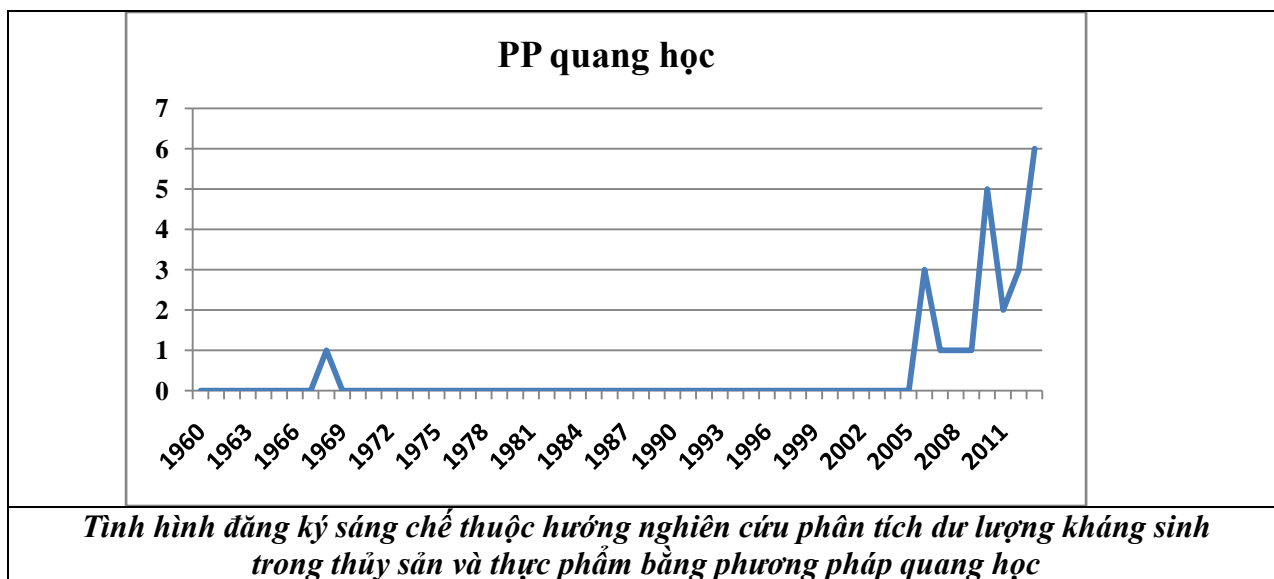
c. Hướng nghiên cứu phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm bằng phương pháp hấp phụ, trao đổi ion, cụ thể như phương pháp sắc ký bản mỏng, HPLC (chỉ số phân loại G01N-030): có 27 sáng chế, chiếm tỷ lệ 9% trên tổng lượng sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh.

– Sáng chế đầu tiên thuộc hướng nghiên cứu này được đăng ký vào năm 1984. Theo thời gian, tới năm 2004, mới có sáng chế tiếp theo được đăng ký về phân tích dư lượng kháng sinh bằng phương pháp hấp phụ, trao đổi ion. Lượng sáng chế tập trung nhiều vào năm 2010 (6 sáng chế), năm 2012 (7 sáng chế).



d. Hướng nghiên cứu phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm bằng phương pháp quang học (chỉ số phân loại G01N-021): có 23 sáng chế, chiếm tỷ lệ 7% trên tổng lượng sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh.

– Sáng chế đầu tiên được đăng ký vào năm 1968. Trong những năm gần đây, các sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh bằng phương pháp quang học bắt đầu được quan tâm nhiều hơn, lượng sáng chế đăng ký tăng dần theo thời gian.



Một số sáng chế đăng ký bảo hộ về việc phát hiện dư lượng kháng sinh trong thủy sản:

❖ **Phương pháp miễn dịch phát hiện dư lượng enrofloxacin trong sản phẩm thủy sản**

CN 101458253 A

Ngày nộp đơn: 22.12.2008

– Đây là phương pháp xác định dư lượng kháng sinh enrofloxacin thông qua việc ứng dụng đặc điểm công nghệ Miễn dịch sinh học, sử dụng một kháng thể gắn kết với 1 enzyme thích hợp để làm môi phát hiện sự hiện diện của kháng sinh.

❖ **Bộ kit để phát hiện dư lượng kháng sinh Chloramphenicol**

CN 103389378

Ngày nộp đơn: 08.05.2012

– Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, liên quan đến việc phát hiện dư lượng kháng sinh chloramphenicol trong sản phẩm thủy sản.

- Bộ kit bao gồm kháng thể đơn dòng chống lại Chloramphenicol.
- Theo sáng chế, bộ kit phát hiện dư lượng Chloromycetin có độ đặc hiệu mạnh, độ nhạy cao, an toàn tốt, giới hạn phát hiện thấp hơn mức tối thiểu của chloramphenicol 0.1ng/mL.
- Sáng chế có thể được áp dụng rộng rãi cho các sản phẩm thủy sản được yêu cầu giám sát dư lượng kháng sinh, thuốc thú y hằng ngày.

❖ Kit Elisa huỳnh quang phát hiện dư lượng kháng sinh Chloramphenicol

CN103018450

Ngày nộp đơn: 20-09-2011

- Đây là một phương pháp phát hiện dư lượng Chloramphenicol đơn giản, nhanh chóng, có độ chính xác cao, thời gian phát hiện giảm đáng kể so với phương Elisa đo màu thông thường. Theo sáng chế, phương pháp này có thể được sử dụng để phát hiện dư lượng Chloramphenicol trong mô động vật (thịt lợn, thịt gà, gan lợn, gan gà), thủy sản (cá, tôm) và sữa.

❖ Phương pháp phân tích dư lượng thuốc kháng sinh và sulfanilamide trong sản phẩm thủy sản

CN 101639466

Ngày nộp đơn: 15.08.2009

❖ Phương pháp để phát hiện dư lượng chloramphenicol, thiamphenicol, metronidazole trong tôm

CN 102645501

Ngày nộp đơn: 13.12.2011

4. Nhận xét:

- Đầu thập niên 60 đã có sáng chế đăng ký về Phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm. Trong giai đoạn đầu, lượng sáng chế đăng ký chưa nhiều, bắt đầu tập trung nhiều trong 10 năm gần đây.

- Hiện nay, sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm được đăng ký bảo hộ ở khoảng 17 quốc gia trên toàn thế giới. Trong đó, lượng sáng chế đăng ký bảo hộ chủ yếu ở Trung Quốc, chiếm 57% trên tổng lượng sáng chế về phân tích dư lượng kháng sinh đăng ký bảo hộ ở 17 quốc gia.

- Phần lớn các sáng chế đăng ký bảo hộ tập trung vào hướng nghiên cứu phát hiện dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm thông qua phương pháp miễn dịch, sử dụng kháng thể đơn dòng, lượng sáng chế thuộc hướng nghiên cứu này tập trung nhiều trong những năm 2010-2011. Trong những năm gần đây, phương pháp quang học bắt đầu được quan tâm trong việc hỗ trợ phát hiện dư lượng kháng sinh trong các sản phẩm phục vụ nhu cầu đời sống con người.

III. PHÂN TÍCH THUỐC THÚ Y THỦY SẢN BẰNG KỸ THUẬT LC-MS/MS – THUẬN LỢI VÀ KHÓ KHĂN

1. Sử dụng hóa chất, kháng sinh trong sản xuất kinh doanh thủy sản:

Để đảm bảo an toàn cho sức khỏe, xu hướng chung là giảm tối đa việc sử dụng thuốc thú y trong đó có kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi.

Một số thuốc thú y bị cấm, không được có trong thực phẩm như thủy sản, thịt gia súc, gia cầm (chloramphenicol, malachite green và leuco malachite green, crystal violet và leuco crystal violet, nitrofurans, nitroimidazoles...)

Ngày 25/2/2014, Bộ NN&PTNT đã ban hành văn bản hợp nhất số 08/VBHN-BNNPTNT danh mục thuốc, hoá chất, kháng sinh cấm sử dụng, hạn chế sử dụng. Theo đó, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ban hành :

- Danh mục hoá chất, kháng sinh cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản (Phụ lục 1)

- Danh mục thuốc, hoá chất, kháng sinh cấm sử dụng trong thú y (Phụ lục 2).

- Danh mục hoá chất, kháng sinh hạn chế sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản (Phụ lục 3)

- Danh mục thuốc, hoá chất, kháng sinh hạn chế sử dụng trong thú y (Phụ lục 4)

Thông tư này có hiệu lực sau 45 ngày kể từ ngày ký.

Thông tư này thay thế cho các quyết định sau:

✓ Quyết định số 07/2005/QĐ-BTS ngày 24/2/2005 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản về việc ban hành Danh mục hoá chất, kháng sinh cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản

✓ Quyết định 26/2005/QĐ-BTS ngày 18/8/2005 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản về việc bổ sung Danh mục kháng sinh nhóm Fluoroquinolones cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản XK vào thị trường Mỹ và Bắc Mỹ

✓ Quyết định số 41/2008/QĐ-BNN ngày 05/3/2008 của Bộ trưởng Bộ NN&PTNT ban hành Danh mục thuốc thú y được phép lưu hành hạn chế sử dụng, cấm sử dụng tại Việt Nam năm 2008

**Danh mục hóa chất, kháng sinh cấm sử dụng
trong sản xuất, kinh doanh thủy sản**

(Ban hành kèm theo Thông tư số 15/2009/TT-BNN ngày 17 tháng 3 năm 2009 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn)

TT	Tên hoá chất, kháng sinh	Đối tượng áp dụng
1	Aristolochia spp và các chế phẩm từ chúng	Thức ăn, thuốc thú y, hoá chất, chất xử lý môi trường, chất tẩy rửa khử trùng, chất bảo quản, kem bôi da tay trong tất cả các khâu sản xuất giống, nuôi trồng động thực vật dưới nước và lưỡng cư, dịch vụ nghề cá và bảo quản, chế biến.
2	Chloramphenicol	
3	Chloroform	
4	Chlorpromazine	
5	Colchicine	
6	Dapsone	
7	Dimetridazole	
8	Metronidazole	
9	Nitrofurán (bao gồm cả Furazolidone)	
10	Ronidazole	
11	Green Malachite (Xanh Malachite)	
12	Ipronidazole	
13	Các Nitroimidazole khác	
14	Clenbuterol	
15	Diethylstilbestrol (DES)	
16	Glycopeptides	
17	Trichlorfon (Dipterex)	
18	Gentian Violet (Crystal violet)	
19	Nhóm Fluoroquinolones (cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản xuất khẩu vào thị trường Mỹ và Bắc Mỹ)	
20[4]	Trifluralin	

21[5]	Cypermethrin	
22[6]	Deltamethrin	
23[7]	Enrofloxacin	

Danh mục thuốc, hoá chất, kháng sinh cấm sử dụng trong thú y
(Ban hành kèm theo Thông tư số 15/2009/TT-BNN ngày 17 tháng 3 năm 2009 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn)

TT	Tên hoá chất, kháng sinh
1	Chloramphenicol (Tên khác Chloromycetin;Chlornitromycin; Laevomycin,Chlorocid, Leukomycin)
2	Furazolidon và dẫn xuất của nhóm Nitrofuran (Nitrofuran, Furacillin, Nitrofurazon, Furacin, Nitrofurantoin, Furoxon, Orafuran, Furadonin, Furadantin, Furaltadon, Payzone, Furazolin, Nitrofurmethon, Nitrofuridin, Nitrovin)
3	Dimetridazole (Tên khác: Emtryl)
4	Metronidazole (Tên khác: Trichomonacid, Flagyl, Klion, Avimetronid)
5	Dipterex (Tên khác: Metriphonat,Trichlorphon, Neguvon, Chlorophos,DTHP); DDVP (Tên khác Dichlorvos; Dichlorovos)
6	Eprofloxacin
7	Ciprofloxacin
8	Ofloxacin
9	Carbadox
10	Olaquidox
11	Bacitracin Zn
12[8]	(được bãi bỏ)
13	Green Malachite (Xanh Malachite)
14	Gentian Violet (Crystal violet)

Danh mục hoá chất, kháng sinh hạn chế sử dụng

trong sản xuất kinh doanh thủy sản

(Ban hành kèm theo Thông tư số 15/2009/TT-BNN ngày 17 tháng 3 năm 2009 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn)

TT	Tên hoá chất, kháng sinh	Dư lượng tối đa (MRL)(ppb)
1	Amoxicillin	50
2	Ampicillin	50
3	Benzympenicillin	50
4	Cloxacillin	300
5	Dicloxacillin	300
6	Oxacillin	300
7	Oxolinic Acid	100
8	Colistin	150
9[9]	(được bãi bỏ)	
10[10]	(được bãi bỏ)	
11	Diflubenzuron	1000
12	Teflubenzuron	500
13	Emamectin	100
14	Erythromycine	200
15	Tilmicosin	50
16	Tylosin	100
17	Florfenicol	1000
18	Lincomycine	100
19	Neomycine	500
20	Paromomycin	500
21	Spectinomycin	300
22	Chlortetracycline	100
23	Oxytetracycline	100
24	Tetracycline	100

25	Sulfonamide (các loại)	100
26	Trimethoprim	50
27	Ormetoprim	50
28	Tricainemethanesulfonate	15-330
29	Danofloxacin	100
30	Difloxacin	300
31[11]	Ciprofloxacin	100
32	Sarafloxacin	30
33	Flumequine	600

Danh mục thuốc, hoá chất, kháng sinh hạn chế sử dụng trong thú y
(Ban hành kèm theo Thông tư số 15/2009/TT-BNN ngày 17 tháng 3 năm 2009 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn)

TT	Tên thuốc, hoá chất, kháng sinh
1	Improvac (số ĐK: PFU-85 của nhà sản xuất Pfizer Australia Pty Limited)
2	Spiramycin
3	Avoparcin
4	Virginiamycin
5	Meticlorpidol
6	Meticlorpidol/Methylbenzoquate
7	Amprolium (dạng bột)
8	Amprolium/ethopate
9	Nicarbazin
10	Flavophospholipol
11	Salinomycin
12	Avilamycin
13	Monensin
14[12]	Tylosin phosphate

2. Kiểm định thuốc thú y trong thực phẩm

Một số phương pháp định lượng có thể được áp dụng để kiểm định thuốc thú y trong thực phẩm, tuy nhiên đáng tin cậy nhất là sắc ký lỏng ghép khối phổ:

- ✓ Giúp định danh tốt
- ✓ Giúp định lượng tương đối chính xác, đảm bảo tốt: độ đúng, độ lặp lại, độ nhạy

Nhược điểm của sắc ký lỏng ghép khối phổ: nếu khâu chuẩn bị mẫu không tốt thì trở ngại cho định lượng là ảnh hưởng đến nền mẫu, có thể làm sai lệch rất lớn kết quả.

❖ Khâu chuẩn bị mẫu:

- Giai đoạn rất quan trọng để tách được chất phân tích ra khỏi chất nền mẫu vì hàm lượng chất phân tích rất nhỏ so với tạp trong nền mẫu.
- Thường tốn rất nhiều thời gian: khoảng 70% tổng thời gian cho kiểm nghiệm, ngoại trừ có thể thực hiện trực tuyến trong một số ít trường hợp.
- Giai đoạn này ảnh hưởng đến sức khỏe người thao tác và gây ô nhiễm nhiều do sử dụng dung môi, tác chất ít nhiều độc hại.

❖ Các yêu cầu trong khâu chuẩn bị mẫu:

- Chiết được cùng lúc nhiều chất
- Hiệu suất chiết phải đạt gần 100%
- Giới hạn phát hiện phải thấp
- Ít tạp chất đi kèm theo để giảm tối đa ảnh hưởng của nền mẫu và tăng độ chọn lọc, độ lặp lại tốt
- Độ ổn định của phương pháp chiết đạt tốt, áp dụng được cho nhiều nền mẫu khác nhau
- Sử dụng càng ít mẫu càng tốt để giảm hiệu ứng nền, nhưng phải đảm bảo được tính đại diện của mẫu phân tích
- Sử dụng ít hóa chất trong tách chiết, an toàn cho người thao tác, ít gây ô nhiễm môi trường

❖ Những vấn đề cần chú trọng ở khâu chuẩn bị mẫu:

- Bản chất của nền mẫu, bản chất của chất phân tích

- Mức độ hấp phụ của chất phân tích trên nền mẫu
- Bản chất của tạp: hàm lượng tạp đi kèm không những gây khó khăn trong tách chiết chất phân tích, làm giảm hiệu suất chiết chất phân tích, tạo trở ngại cho khâu định lượng

❖ **Những thuận lợi trong chuẩn bị mẫu:** các kỹ thuật tách chiết và clean-up thông dụng trong phân tích kháng sinh:

- Kỹ thuật chiết nhanh với dung môi (Accelerated Solvent Extraction - ASE), chiết dưới tác dụng vi sóng, siêu âm.

- Kỹ thuật chiết lỏng lỏng trên pha rắn (Solid Supported liquid-liquid extraction SLE): đơn giản, ít tổn dung môi, không bị nhũ

- Kỹ thuật ly trích trên pha rắn có cải tiến (Solid Phase Extraction SPE) như: cột đa cơ chế Mixed Mode SPE

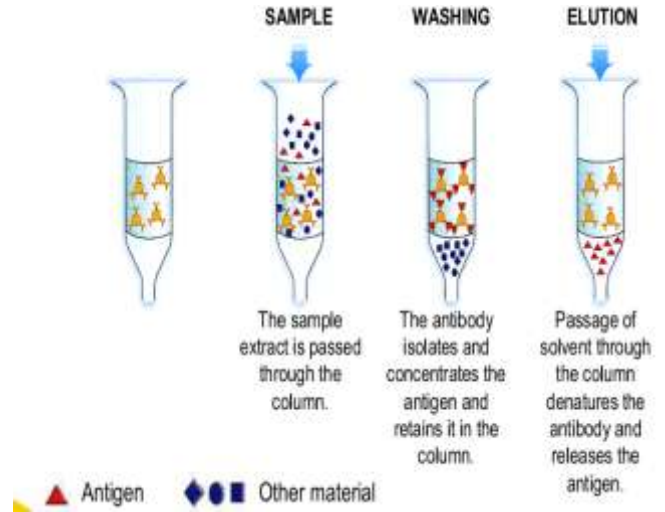
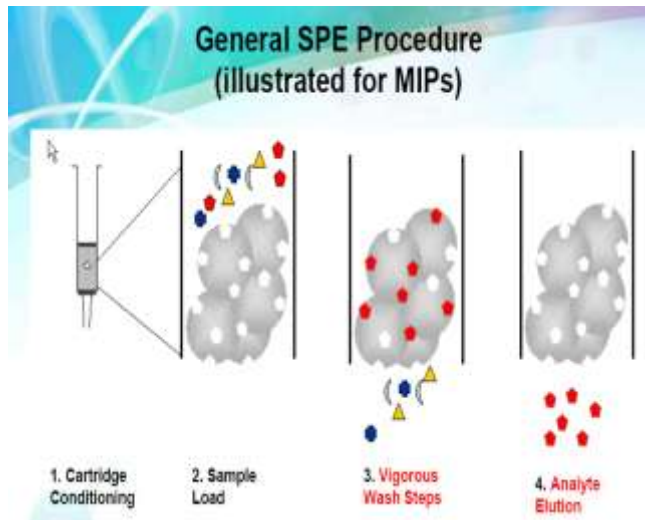
- ✓ cột đặc hiệu MIPSPE
- ✓ cột ái lực miễn dịch (Immunoaffinity column)
- ✓ bộ kit QuEChERS áp dụng cho phân tích thuốc bảo vệ thực vật, đã được mở rộng ra thêm cho một số đối tượng kháng sinh, thuốc thú y

Kỹ thuật chiết nhanh ASE



Mixed Mode SPE





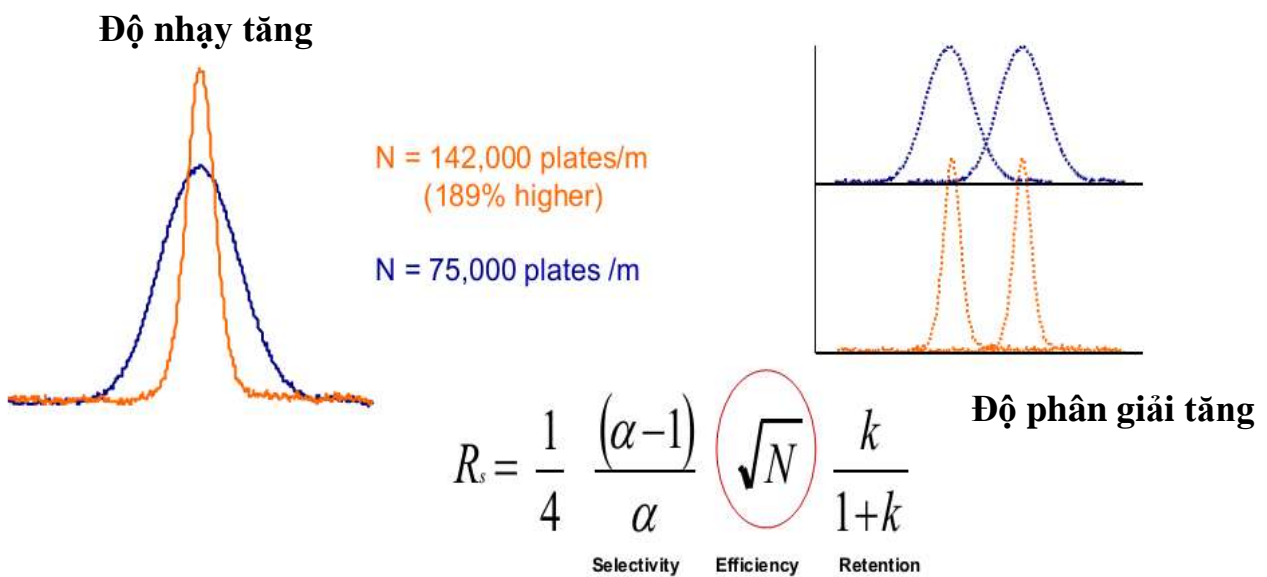
3. Những thuận lợi về thiết bị phân tích:

3.1. Thiết bị sắc ký lỏng siêu nhanh UPLC

Kỹ thuật sắc ký lỏng siêu nhanh (UPLC): giảm đáng kể thời gian phân tích, tăng độ nhạy và độ phân giải.

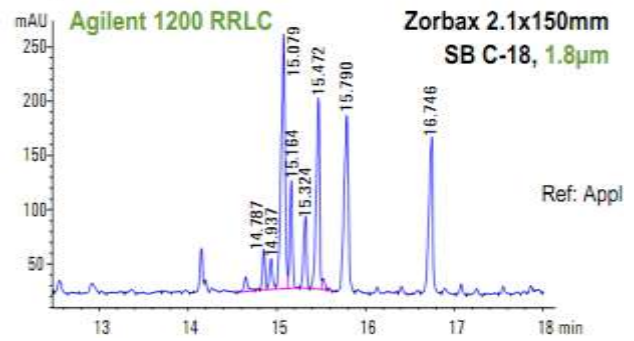
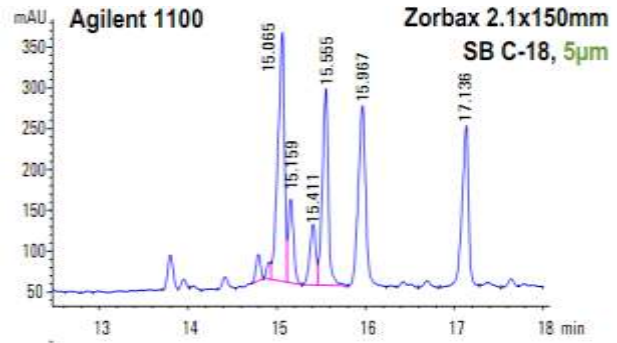
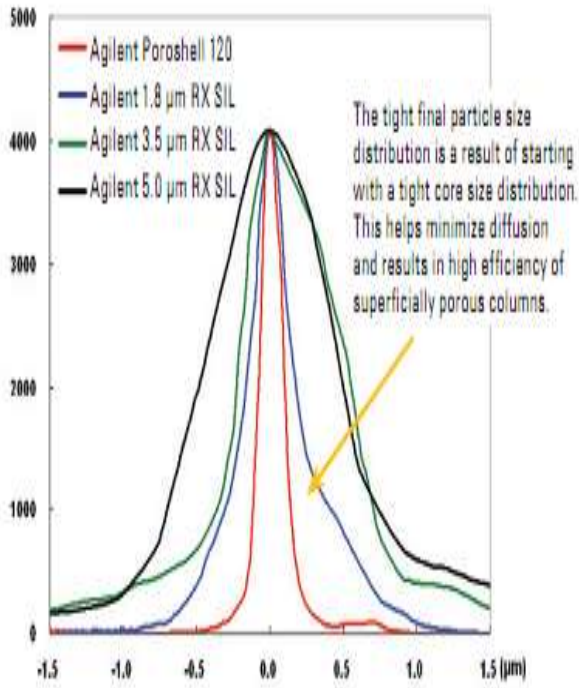
Những loại cột sắc ký lỏng đặc biệt như cột rỗng Poroshell, cột đa cơ chế Mixed Mode, cột Hilic: góp phần nâng cao độ nhạy và độ phân giải của thiết bị phân tích.

Cột lõi rắn Poroshell, Kinetex, Accucore



Mũi thon:

- Độ phân giải tăng
- Độ nhạy tăng, LOD hạ thấp
- Đo đa dư lượng có hiệu quả



NEXERA



ACCELA



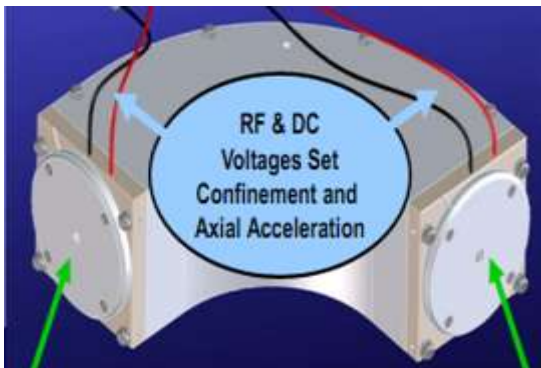
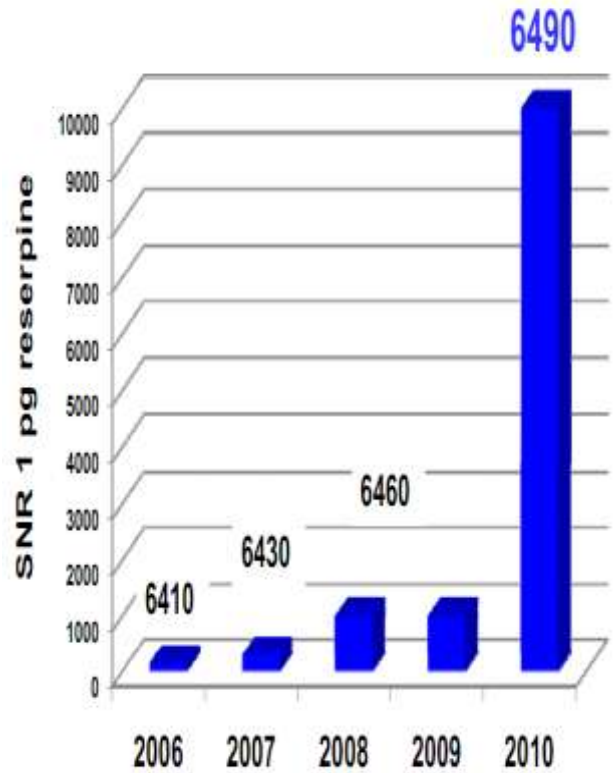
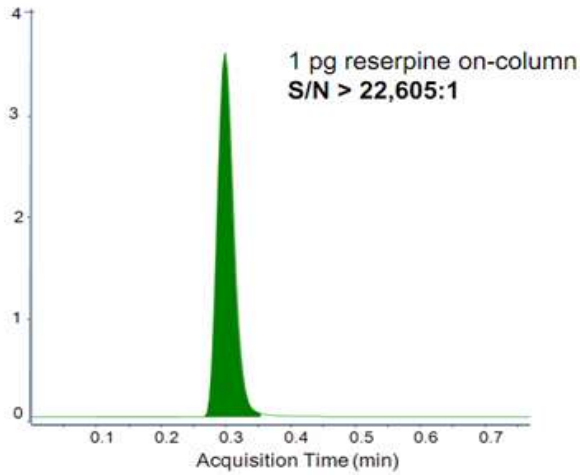
FLEXAR FX 15



AGILENT 1290

3.2. Cải tiến đầu dò khối phổ:

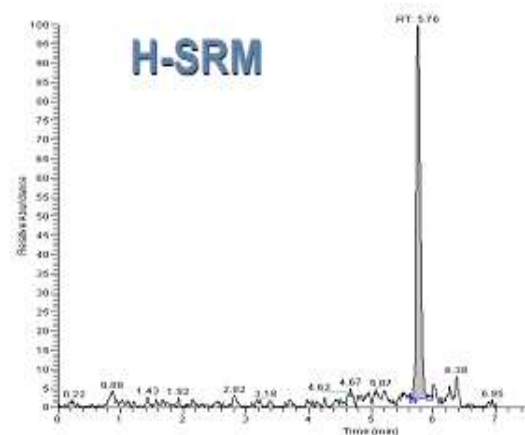
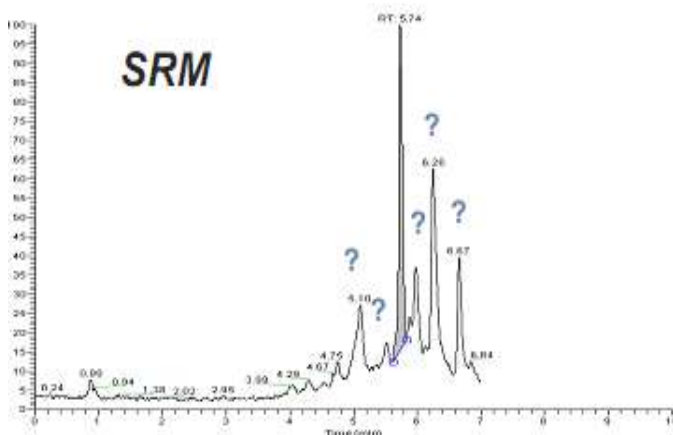
- Lợi thế: xác nhận tốt hóa chất bằng thời gian lưu và nhờ những mảnh ion đặc trưng (LC-MS, LC-MSMS) và định lượng tốt nhờ nâng cao độ nhạy bằng cách khử nhiễu nền thích hợp
- LC-MS: sử dụng nhiều trong nước phân tích vết hữu cơ trong thực phẩm.
- LC-MSMS được sử dụng trong phân tích dư lượng trong những nền mẫu phức tạp.
- Các đầu dò khối phổ liên tục được cải tiến ở bốn khâu:
 - ✓ Hiệu suất tạo ion ở bộ phận tạo ion
 - ✓ Hiệu suất chuyển ion của bộ phận chuyển ion từ bộ tạo ion đến bộ phân tích khối
 - ✓ Cách khử các tạp trung hòa trong quá trình tạo ion hay phân mảnh ion
 - ✓ Cách phát hiện ion ở detecto
- Mục tiêu cuối cùng:
 - ✓ Tăng độ nhạy và độ phân giải
 - ✓ Cho phép phân tích những hàm lượng chất rất nhỏ trong nền thực phẩm rất phức tạp

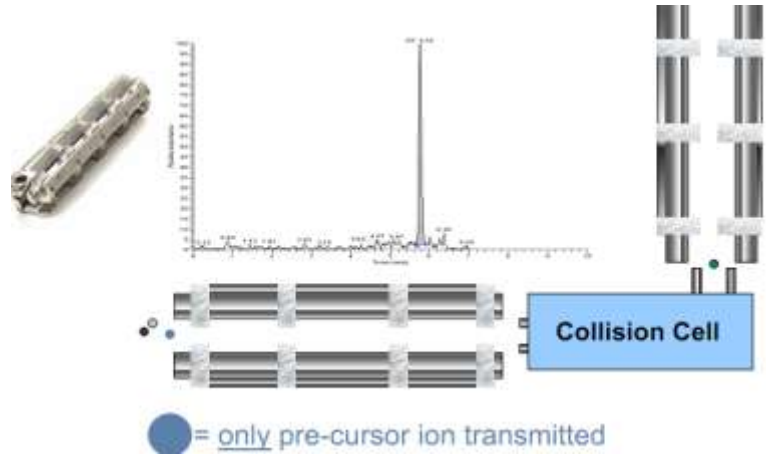


Lỗ ra hẹp hơn-tập trung ion vào Q3

Lỗ vào rộng - ion vào nhiều

LC-MSMS của Thermo Fisher với kỹ thuật H-SRM cho phép cài đặt Q1=0,1 Da, loại được các ion có phân tử khối rất gần ion phân tích, do đó tăng độ phân giải và độ chọn lọc





4. Nhận danh và định lượng những chất không biết có trong nền mẫu

UPLC-MS/MS QqQ cải tiến với phần mềm thích hợp có thể giúp xác nhận những kháng sinh khác có thể có trong mẫu ngoài kháng sinh nhằm định lượng. Phần mềm này phải chứa những dữ liệu đầy đủ liên quan đến các chất ấy:

- ✓ tiền ion để phân mảnh (precursor ion)
- ✓ 2 ion con trong đó có một ion định lượng (quantifier ion) có cường độ lớn
- ✓ ion thứ 2 còn gọi là ion xác nhận (qualifier ion)
- ✓ năng lượng phân mảnh của mỗi ion con
- ✓ thời gian lưu và khoảng sai chấp nhận được
- ✓ tỷ lệ cường độ ion xác nhận/cường độ ion định lượng

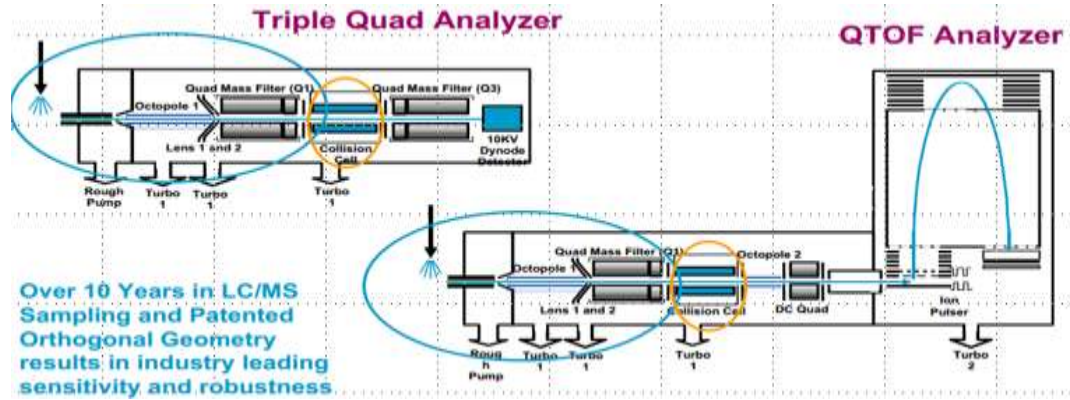
Giới hạn của LC-MS QqQ là độ phân giải không thật cao.

❖ Kỹ thuật LC-Q-TOF MS:

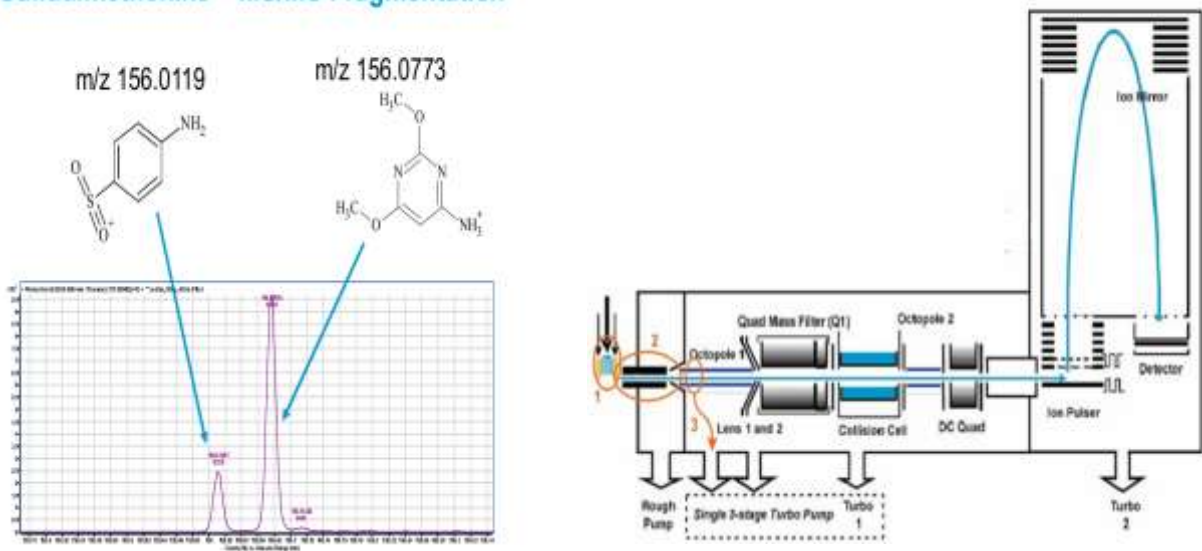
Kỹ thuật LC-Q-TOF MS đạt độ phân giải rất cao (10000-40000), cho phân tử khối rất chính xác có tầm áp dụng rộng hơn và trên nguyên tắc có thể nhận danh và định lượng tất cả những chất không nhắm tới. Giới hạn là độ nhạy tuy đã có cải tiến thật nhiều nhưng chưa nhận được các nồng độ chất thật nhỏ:

- ✓ Full scan MS: tìm các chất có cường độ mũi sắc ký trên ngưỡng cài đặt
- ✓ Với mỗi chất, máy tự động phân mảnh cho Full MSMS
- ✓ Có các phân tử khối chính xác (sai số cỡ ppm) của precursor ion, các ion đồng vị, các mảnh ion con

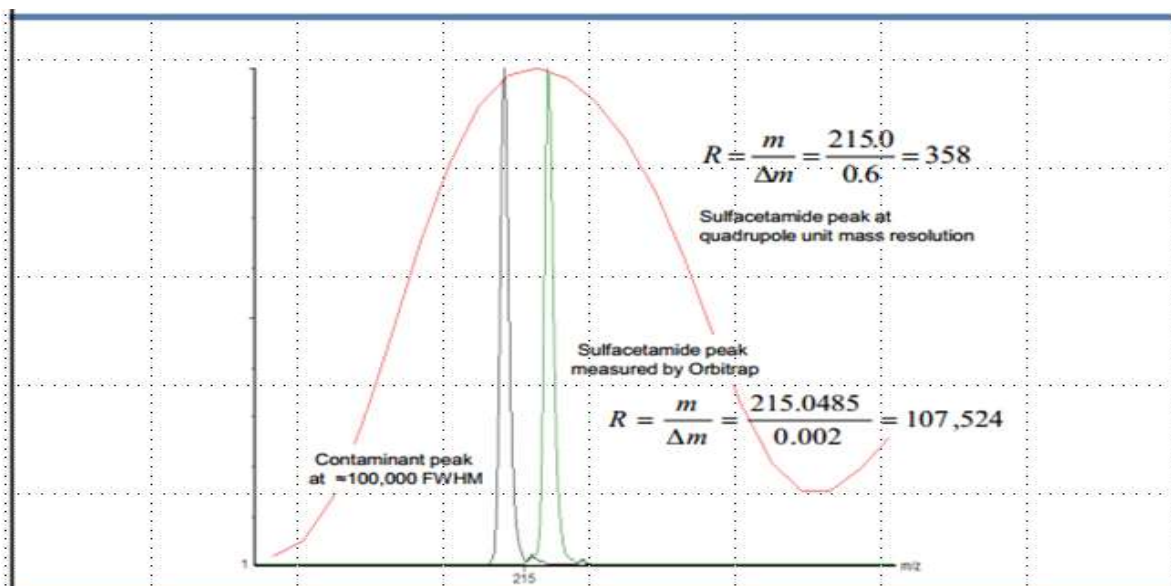
- ✓ Có công thức nguyên tương ứng với các ion đó, suy ra cấu trúc của chất



Sulfadimethoxine – MS/MS Fragmentation



Hệ thống ORBITRAP của THERMO với độ phân giải cực cao



5. Một số thí dụ về phân tích thuốc thú y tại công ty dịch vụ KH&CN Sắc Ký Hải Đăng

5.1. Phân tích tại Công ty EDC-HD Chloramphenicol trong thủy sản mua trong các chợ và siêu thị TP Hồ Chí Minh

Phương pháp chiết: FDA LIB 290, 18 (9), tháng 9/2002

Đường chuẩn xây dựng trên nền mẫu trắng là cá, sử dụng chuẩn chloramphenicol (CAP) và nội chuẩn đồng vị CAP-d5

Thiết bị: LC/MS/MS TSQ Quantum Access của Thermo Fisher Scientific

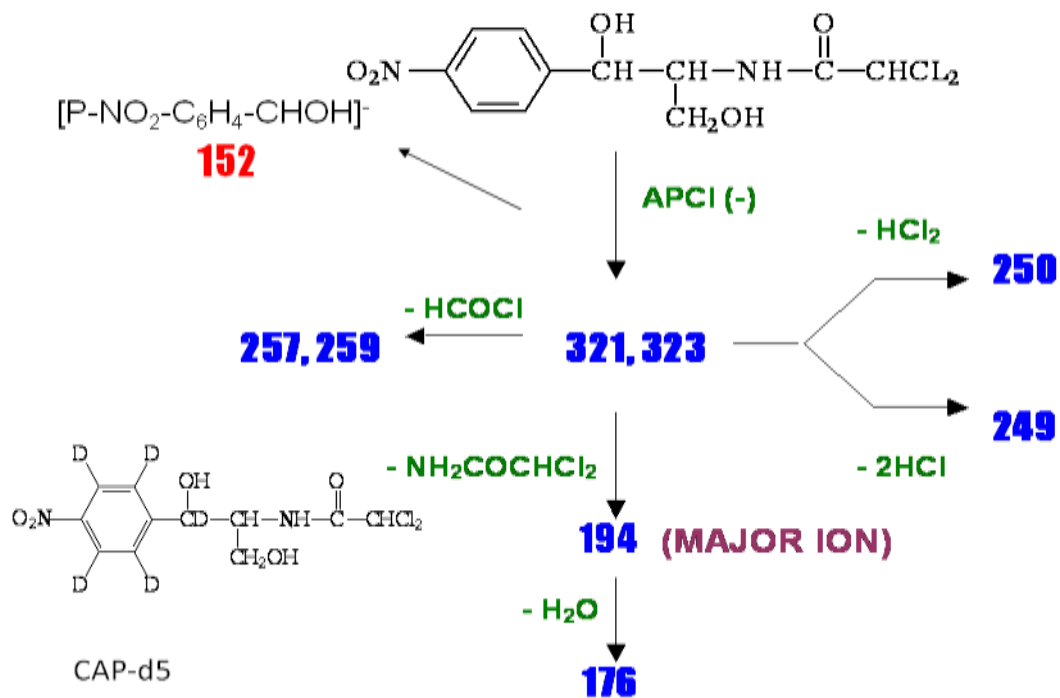
HPLC:

- Cột: Hypersil Gold aQ, 100 mm x 2,1 mm x 3 μ m
- Pha động: MeOH : H₂O (10 : 90)
- Nhiệt độ lò cột: 40°C
- Tốc độ dòng: 0,3 mL/phút; thể tích bơm: 25 μ l

MS:

- Chế độ: ESI (-), SRM (theo chương trình có sẵn), Q1, Q3: 0,7 Da
- Ion xác nhận: m/z 321>194, CE: 12V, 321>152, CE: 21V
- Ion định lượng: m/z 321>152, CE: 21V
- Ion nội chuẩn: m/z 326>157, CE19V
- Tỷ lệ cường độ ion 152/ion 194: 0,52 (0,41- 0,63)

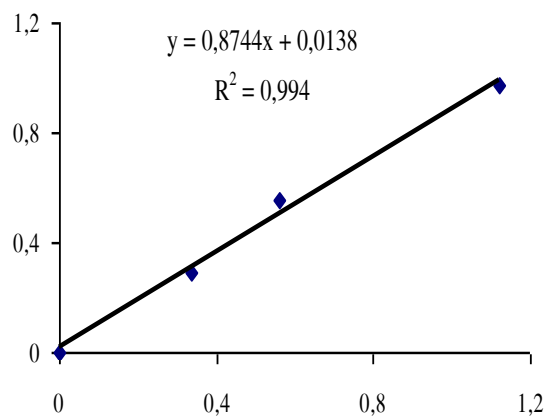
PHÂN MẢNH ION TRONG CHLORAMPHENICOL (LC/MS/MS)



Tỷ lệ Cường độ S/IS cho dung dịch

C_0	A_{152}	A_{157}	Tỷ lệ
0	0	0	0
0,336	3425	11680	0,293
0,56	5523	10022	0,551
1,12	10591	10878	0,973

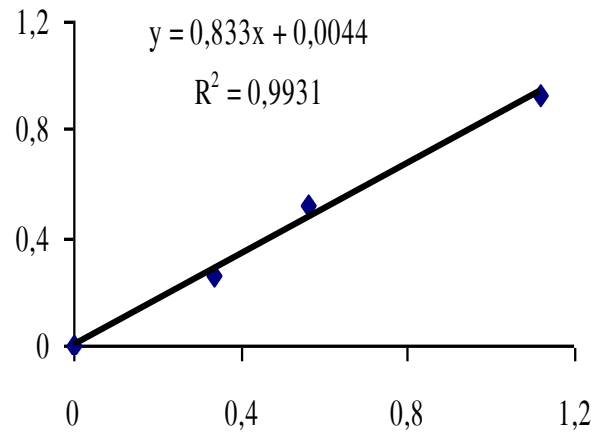
S/IS theo nồng độ CAP trong dung



Tỷ lệ Cường độ S/IS với S và IS thêm vào mẫu trước khi tách chiết, clean-up

Co	A ₁₅₂	A ₁₅₇	Tỷ lệ
0	0	0	0
0,336	2869	11155	0,257
0,56	5452	10526	0,518
1,12	10527	11421	0,922

S/IS theo [S] với S và IS thêm vào mẫu trước khi tách chiết, clean-up



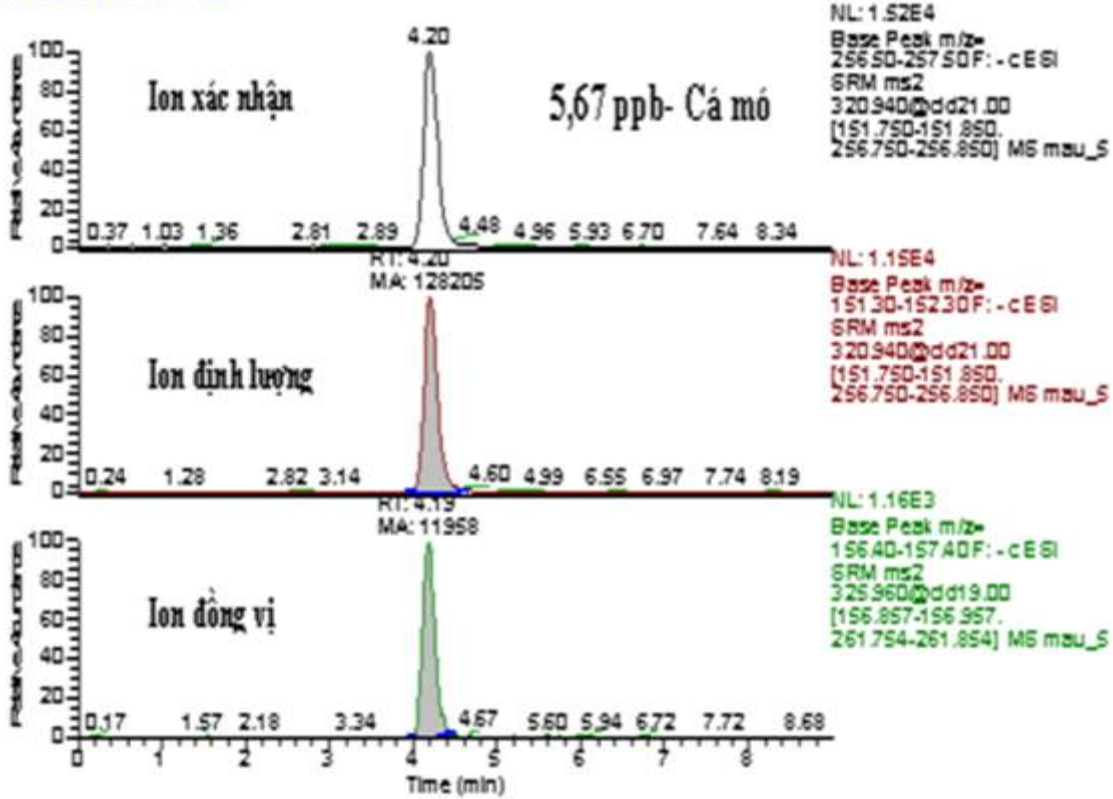
Kết quả phân tích CAP trong các mẫu cá

N ⁰	A ₁₅₂	A ₁₅₇	C ₀ (ppb)	N ⁰	A ₁₅₂	A ₁₅₇	C ₀ (ppb)
1	2306	11820	0,125	6	2183	10702	0,239
2	13919	11352	0,649	7	12187	25014	0,579
3	1497	12494	0,087	8	13237	24348	0,302
4	3668	8367	0,249	9	7567	16973	0,530
5	7979	29891	0,315	10	5140	12742	0,403

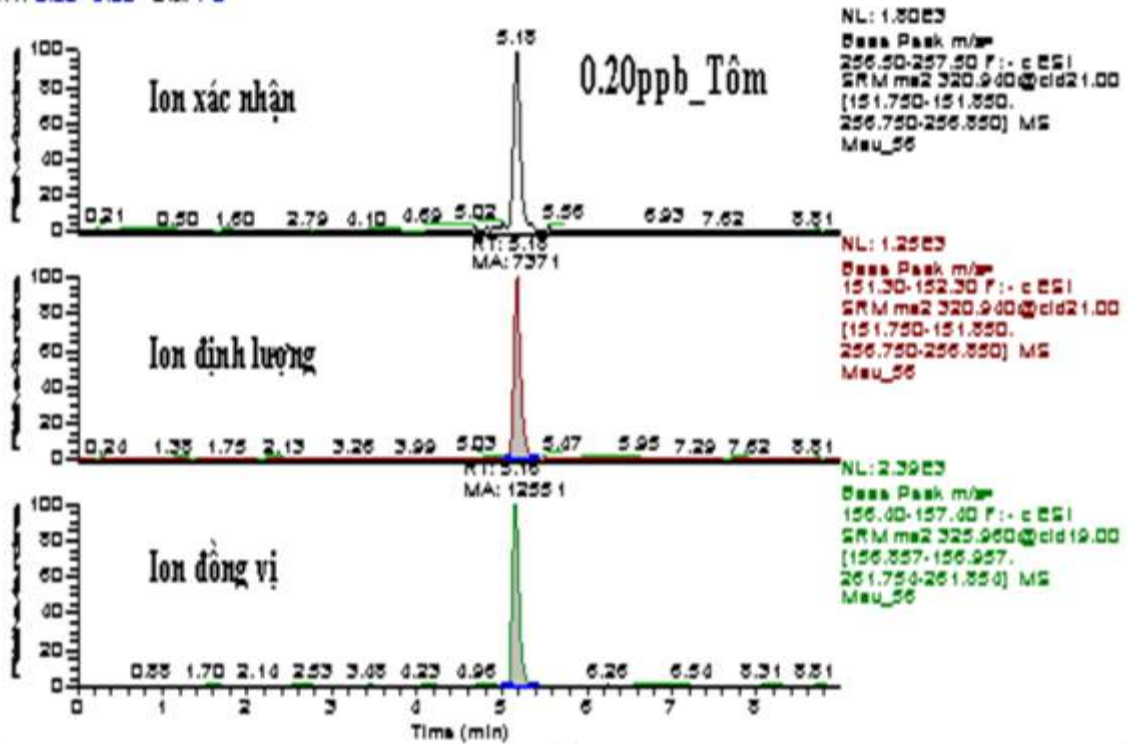
Kết quả trên (mẫu số 4, 5, 7, 8, 9) cho thấy việc sử dụng nội chuẩn đồng vị là cần thiết.



RT: 0.00-9.00 SM: 70

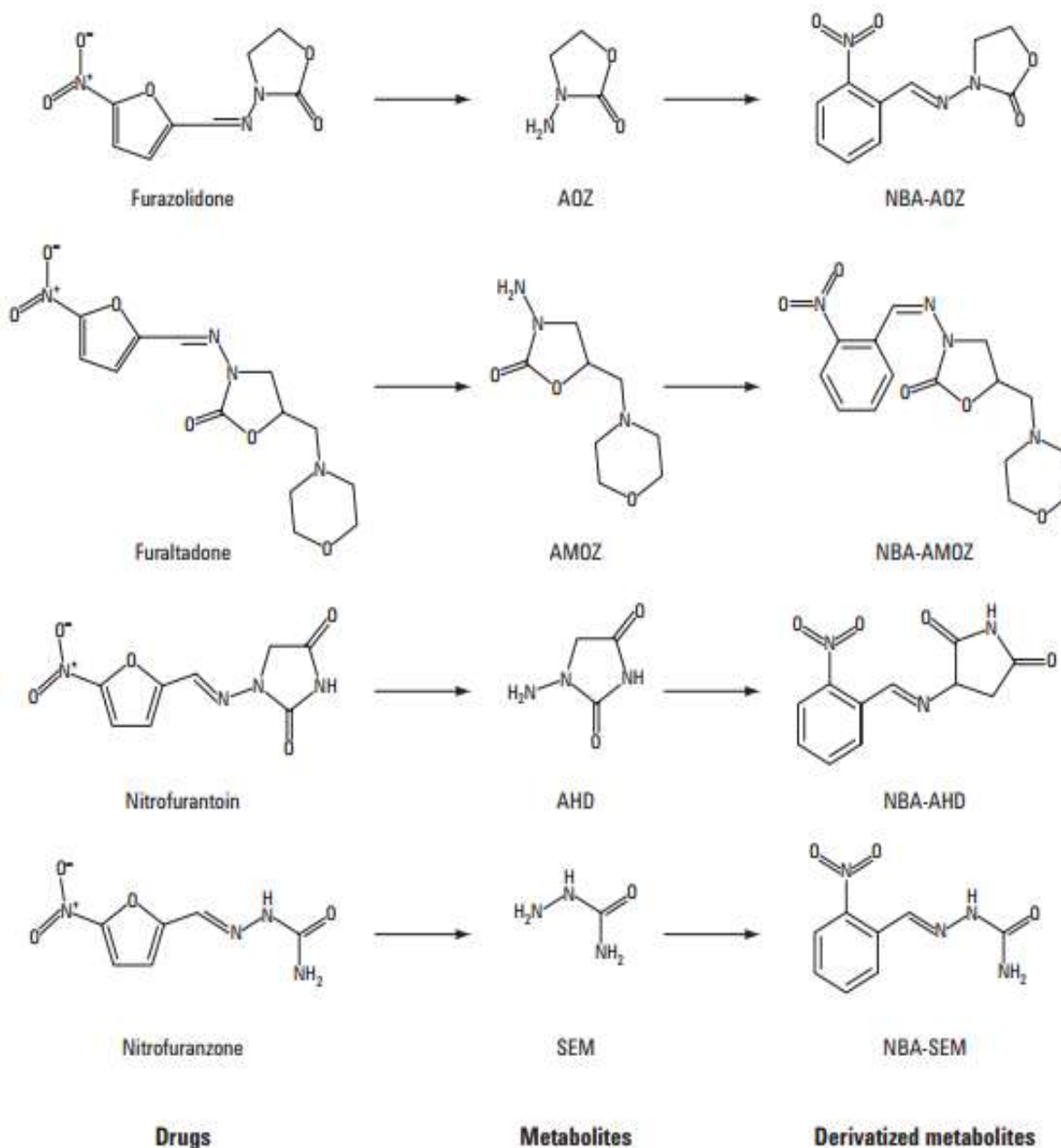


RT: 0.00-9.00 SM: 70



5.2. Phân tích Nitrofurans trong tôm tại công ty EDC- HD

Công thức:



Thiết bị LC-MS/MS sử dụng: TSQ Quantum Access Thermo-Fisher Scientific
HPLC: Surveyor MS pump Plus + Surveyor Autosampler Plus

- ✓ Column: Agilent Poroshell 120 EC-C18; 100 mm x 2,1 mm x 2,7 μm
- ✓ Pha động: MeOH(0,1% HCOOH)-H₂O (0,1% HCOOH) –gradient

- ✓ Thê tích tiêm: 10 μ L
- ✓ Tốc độ dòng: 0,2 mL/phút

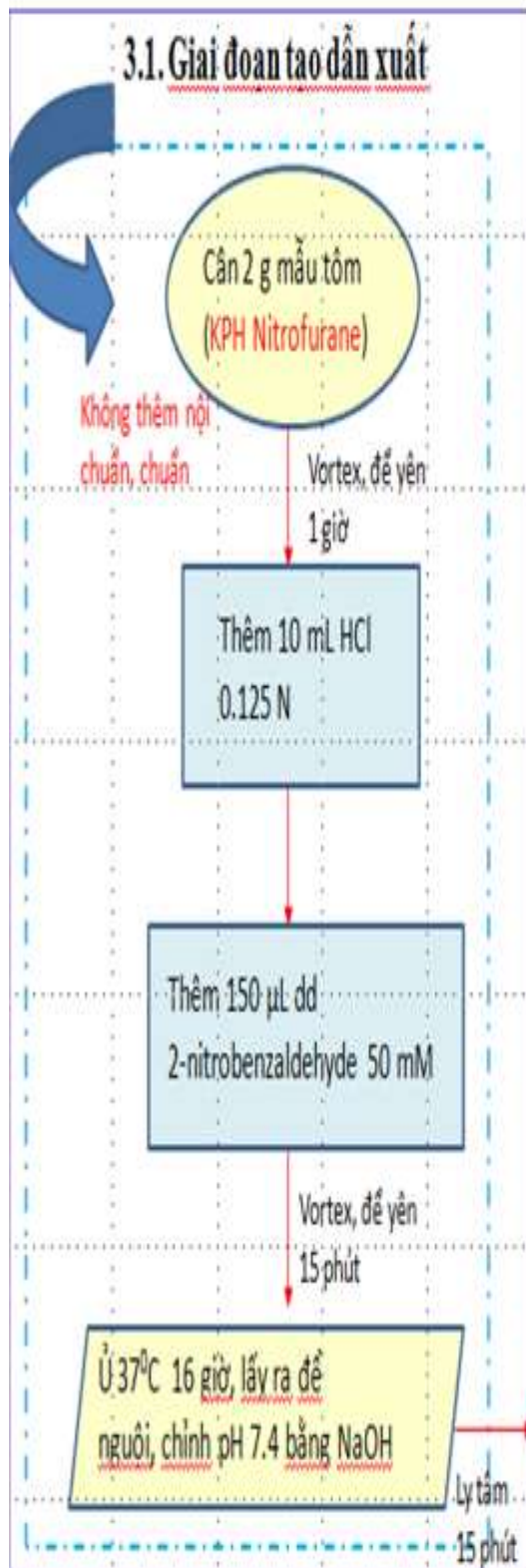
MS: Thermo-Fisher Scientific TSQ Quantum Access

- ✓ Chế độ ion hóa: APCI (+)-Tuning File
- ✓ Q1, Q3: 0,7 amu FWHM

Điều kiện tối ưu tạo ion:

Chất phân tích	Chất đo	Ion bị phân mảnh, m/z	Ion được tạo thành, m/z (CE)	Q1, Q3 PW, amu	Tube lens
Furazolidone hay AOZ	2-NB-AOZ	236	<u>134</u> (15) 104 (15)	0,7	93
	2-NB-AOZ-d4	240	134 (15)		
Furaltadon hay AMOZ	2-NB-AMOZ	335	<u>291</u> (13) 262 (13)	0,7	93
	2-NB-AMOZ-d5	340	296 (13)		
Nitrofurazone hay SEM	2-NB-SEM	209	166 (12) <u>192</u> (12)	0,7	91
Nitrofurantoin hay AHD	2-NB-AHD	249	<u>134</u> (15) 104 (15)	0,7	92

Xử lý mẫu:



Dung dịch trong



Khảo sát ảnh hưởng nền mẫu:

Chất phân tích	Ion	Diện tích tb mùi với dung dịch chuẩn hỗn hợp 2NB-NF (n=3)	Diện tích mùi với dung dịch chuẩn hỗn hợp spike sau	Hiệu ứng nền mẫu ME%
2-NB-AOZ	<i>m/z</i> 104	83273	90256	108.4
	<i>m/z</i> 134	207465	217892	105.0
	Area ratio (104/134)	0.40	0.41	-
2-NB-AMOZ	<i>m/z</i> 262	53546	58143	108.6
	<i>m/z</i> 291	338273	365275	108.0
	Area ratio (262/291)	0.16	0.16	-
2-NB-AHD	<i>m/z</i> 104	11225	10319	91.9
	<i>m/z</i> 134	30979	29210	94.3
	Area ratio (104/134)	0.36	0.35	-
2-NB-SEM	<i>m/z</i> 166	44498	48378	108.7
	<i>m/z</i> 192	53228	58522	109.9
	Area ratio (166/192)	0.84	0.83	-

Phương trình đường chuẩn:

Chất phân tích	$Y=ax+b, R^2$
2-NB-AHD	$y = 0.0416x - 0.0023$ $R^2 = 0.9991$
2-NB-SEM	$y = 0.1152x + 0.0024$ $R^2 = 0.998$
2-NB-AOZ	$y = 0.4049x + 0.003$ $R^2 = 0.9991$
2-NB-AMOZ	$y = 0.4752x - 0.0044$ $R^2 = 0.9999$

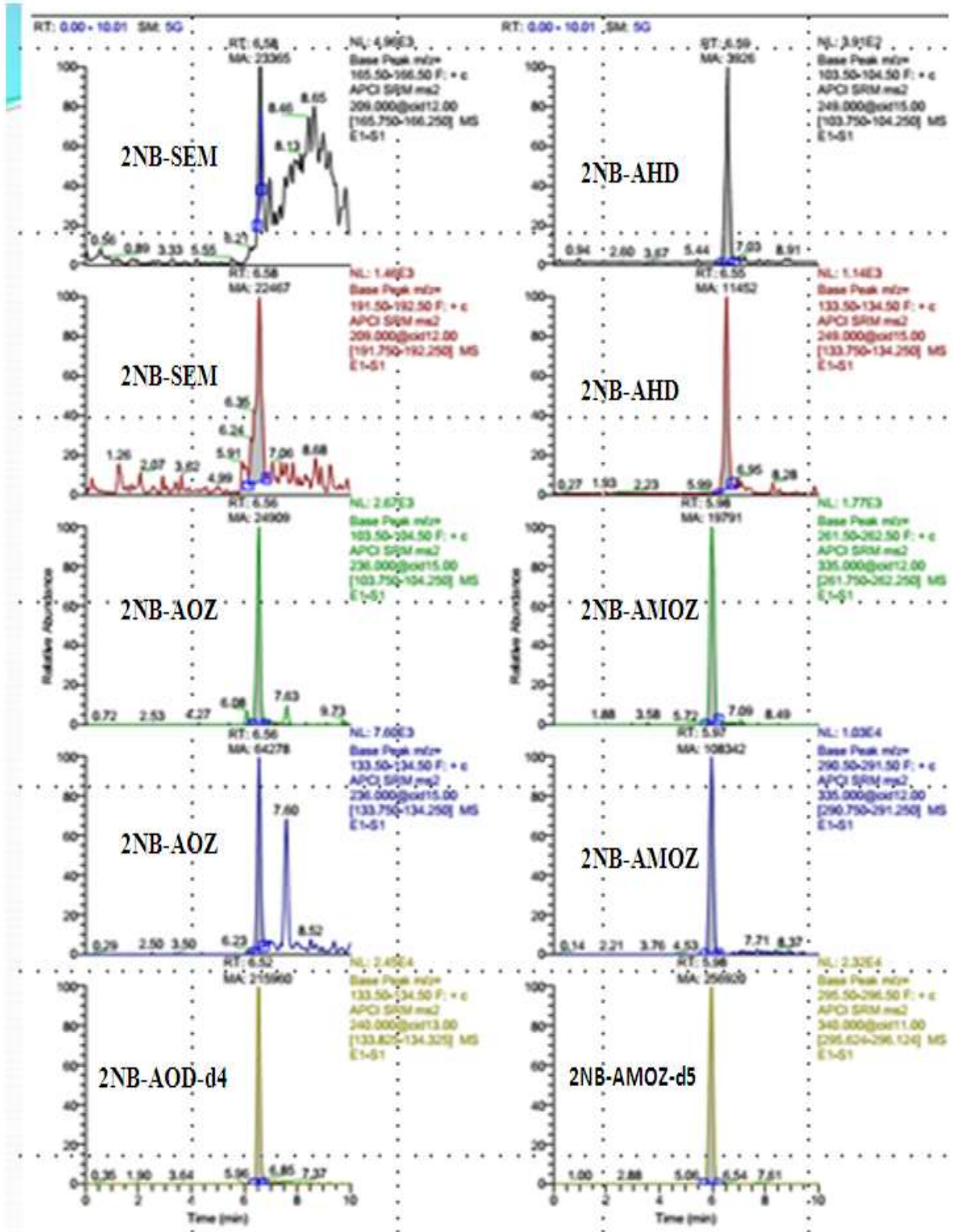
Tỷ lệ thu hồi (%), LOD và LOQ:

Chất phân tích	Nồng độ, (µg/kg)		Hiệu suất thu hồi (%)
	Spike	Định lượng	
2-NB-AHD	1,19	1,17	99
	2,38	2,75	116
2-NB-AOZ	0,66	0,67	102
	1,31	1,32	100
2-NB-AMOZ	1,01	0,92	92
	2,02	2,08	103
2-NB-SEM	0,75	0,86	114
	1,50	1,64	109

Chất phân tích	Nồng độ spike (µg/kg)	S/N _{ave range}	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
2-NB-AOZ	0.165	12	0.04	0.14
2-NB-AMOZ	0.252	10	0.08	0.25
2-NB-AHD	0.297	9	0.10	0.33
2-NBSEM	0.188	8	0.07	0.23

Kết luận: Giá trị LOD phù hợp với MRPL cho mỗi Nitrofurantoin là 1 µg/kg (Commission Decision 2003/181/EC)

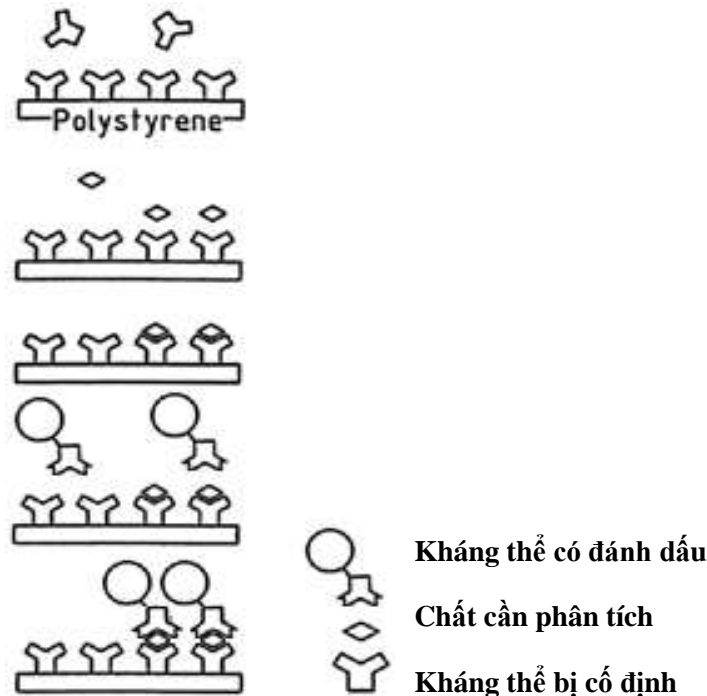
MẪU TRẮNG SPIKE 1 µg/kg



IV. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM DỰA TRÊN MIỀN DỊCH

1. Phương pháp phân tích không cạnh tranh

Đây được gọi là dạng DAS (Double Antibody Sandwich assay) dùng xác định những chất phân tử lớn. Nguyên lý của nó được miêu tả như sau: kháng thể được gắn lên bề mặt chất mang, chất cần phân tích đóng vai trò một kháng nguyên và sẽ bị kháng thể này tóm bắt. Sau khi rửa trôi những chất phản ứng còn dư một kháng thể thứ hai có *đánh dấu* sẽ cho được cho vào để bám lên kháng nguyên đang bị kháng thể thứ nhất giữ lại. Dùng chất chỉ thị tương ứng để phát hiện *kháng thể đánh dấu* để từ đó định lượng kháng nguyên là chất cần phân tích. Những test dạng này nhanh, đơn giản và được dùng chủ yếu phát hiện những phân tử lớn như protein, vi rút, vi trùng. Nó đòi hỏi chất cần phân tích phải có nhiều điểm quyết định kháng nguyên để hai kháng thể riêng lẻ bám vào



Hình: Dạng không cạnh tranh (Double Antibody Sandwich Assay)

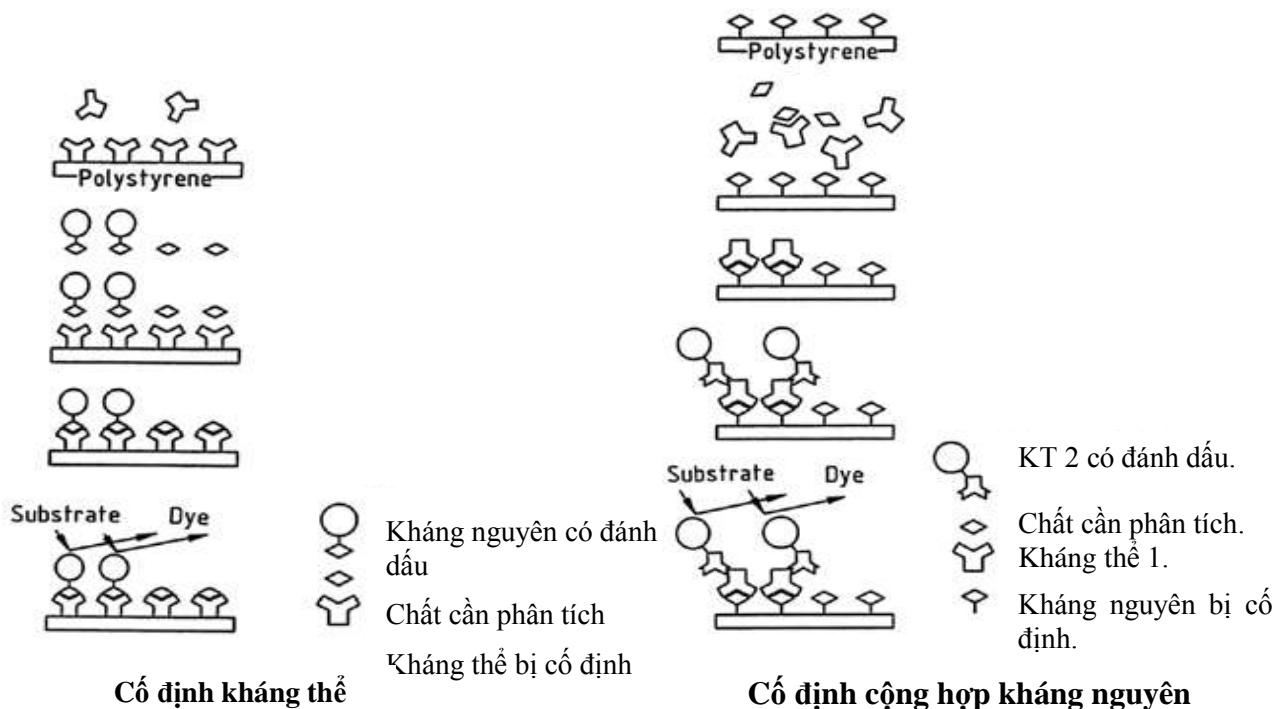
2. Phương pháp phân tích có cạnh tranh

Đối với những chất phân tử nhỏ như thuốc kháng sinh, người ta áp dụng dạng test cạnh tranh. Trong đó có thể chia làm 2 kiểu như sau:

- (1) Cố định kháng thể
- (2) Cố định cộng hợp kháng nguyên

Trong kiểu (1) cần phải có một *kháng nguyên đánh dấu* đã biết trước. Chất cần phân tích có thể coi như là một kháng nguyên chưa biết. Cả hai kháng nguyên đều có thể bị kháng thể tóm bắt. Khi cho cả 2 tiếp xúc với kháng thể đã được phủ cố định trên bề mặt rắn, chúng sẽ cạnh tranh với nhau để cùng bám vào kháng thể. Sau một thời gian cân bằng, rửa trôi các chất còn dư, chất chỉ thị tương ứng để phát hiện kháng nguyên đánh dấu sẽ được cho vào. Lượng kháng nguyên đánh dấu được kháng thể giữ lại sẽ tỉ lệ nghịch với chất cần phân tích, từ đó có thể định lượng chất cần phân tích.

Trong kiểu (2) cộng hợp giữa kháng nguyên và protein sẽ được cố định trên bề mặt rắn. Kháng nguyên chưa biết và một lượng kháng thể cố định được cho vào. Kháng nguyên tự do (chưa biết) và kháng nguyên cố định sẽ cạnh tranh để bám vào kháng thể. Lượng kháng nguyên tự do càng nhiều thì lượng kháng thể bị kháng nguyên cố định giữ lại càng ít. Sau khi rửa trôi các chất còn dư, dùng một kháng thể thứ hai có đánh dấu để phát hiện lượng kháng thể ban đầu bị giữ lại. Từ đó ta có thể suy ra lượng kháng nguyên chưa biết (chất cần phân tích) là bao nhiêu.



Hình: Dạng cạnh tranh

3. Các dạng đánh dấu

3.1. Đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ

Đầu tiên các test dùng miễn dịch đều dùng đồng vị phóng xạ ^{125}I hoặc ^3H để đánh dấu (Radioimmunoassays - RIA). ^{125}I có thể đếm rất nhanh, nhạy và chính xác tuy nhiên thời gian bán phân ngắn. ^3H có thời gian bán phân dài hơn rất nhiều nhưng đòi

hỏi thời gian đếm dài hơn cũng như các phương tiện và hoá chất đắt tiền hơn. Tuy nhiên việc đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ nói chung không phù hợp với yêu cầu tiến hành test nhiều, liên tục và đồng thời nó cũng ảnh hưởng môi trường.

3.2. Đánh dấu bằng enzyme

Đây là phương pháp dùng phổ biến nhất. Enzyme dùng đánh dấu cần phải bền, có tính đặc hiệu và hoạt tính cao đồng thời phải rẻ tiền và có khả năng xúc tác các phản ứng tạo ra phức chất có thể định lượng dễ dàng. Việc tạo các cộng hợp với các enzyme này cần phải dễ dàng và tương đối bền vững.

Hiện nay có 4 enzyme được dùng phổ biến cho mục đích này là: horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, urease và beta-galactosidase. Để nhận biết sự có mặt của các enzyme này, dùng các cơ chất tương ứng để tạo các sản phẩm dễ nhận biết. Sản phẩm cuối cùng của phản ứng thường là: hợp chất có màu (đo rất dễ dàng bằng quang kế), hợp chất phát huỳnh quang (đo bằng huỳnh quang kế, đắt tiền nhưng độ nhạy cao) và hợp chất phát quang (luminometric).

Các enzyme được dùng đặc biệt nhiều trong những test nhanh như "spot test" hoặc "dip stick", khi màu có thể quan sát bằng mắt thường. Thực tế hầu như tất cả các bộ kit thương mại đều dùng phương pháp đánh dấu bằng enzyme.

3.3. Đánh dấu phát quang hoá học

Chất đánh dấu có thể là những chất sẽ phát quang khi được kích thích. Trên lý thuyết phương pháp này có thể phát hiện những nồng độ rất nhỏ.

Hiện nay chất đang được lựa chọn nhiều để gắn lên kháng thể hoặc kháng nguyên là acridinium ester. Khi cho peroxide trong môi trường kiềm vào các sản phẩm đánh dấu bằng acridinium ester sẽ tạo sự phát quang. Phương pháp này sẽ hữu dụng khi cần phân tích nồng độ rất thấp, tuy nhiên đòi hỏi dụng cụ đo tương ứng.

3.4. Đánh dấu huỳnh quang

Những ý tưởng về đánh dấu bằng huỳnh quang theo lý thuyết có thể giúp hạ nồng độ giới hạn phát hiện xuống rất thấp. Tuy nhiên máy móc thiết bị cần thiết cho phương pháp này rất đắt tiền nên phương pháp này hiện nay chưa có ý nghĩa thực tiễn.

4. Ưu và nhược điểm của các phương pháp xét nghiệm dựa trên miễn dịch

4.1. Ưu điểm:

So với các phương pháp phân tích thông thường trong phòng thí nghiệm thì các phương pháp dựa trên miễn dịch có rất nhiều ưu điểm. Các phương pháp này nhanh, cơ động, sử dụng đơn giản, tương đối rẻ tiền và có độ nhạy cao.

Các phương pháp dựa trên miễn dịch không giới hạn cho phân tích một loại chất cụ thể mà có thể phát triển cho rất nhiều loại chất. Tùy theo yêu cầu mà người ta phát triển phương pháp này cho một chất chuyên biệt hay 1 nhóm chất. Đối với các mẫu nước phương pháp này đặc biệt hữu ích vì đơn giản và độ nhạy rất cao.

Tất cả các hoá chất cần cho thí nghiệm thường nhỏ gọn, thuận tiện chuyên chở đi xa. Các thí nghiệm khi tiến hành cũng không đòi hỏi không gian rộng lớn. Ngoài máy photometer, phương pháp này không cần dùng các máy móc khác, do đó có thể thực hiện tại hiện trường chứ không cần phải trong phòng thí nghiệm.

Một người mới có thể học thực hành phương pháp này trong vòng 1 ngày hoặc ít hơn, và việc phân tích 30-50 mẫu một ngày là hoàn toàn có thể. Công việc chuẩn bị và làm sạch mẫu thường đơn giản và đôi khi không bắt buộc. Chi phí cho 1 mẫu thường thấp và sẽ rất rẻ nếu phân tích cùng lúc 1 lượng mẫu lớn.

4.2. Nhược điểm:

Tuy có nhiều ưu điểm nhưng phương pháp phân tích dựa trên miễn dịch cũng có những điểm hạn chế. Người sử dụng cần hiểu rõ những điều này để lựa chọn phương pháp phù hợp nhất với yêu cầu công việc của mình.

Thường các hoá chất dùng trong phương pháp này cần bảo quản lạnh, có một số khá nhạy cảm với ánh sáng, do đó việc bảo quản cần chú ý để tránh làm mất hoạt tính.

Độ chính xác của các phương pháp dựa trên miễn dịch không cao nên chỉ thích hợp cho các phân tích sàng lọc mà không thích hợp cho phân tích định lượng. Một số trường hợp, phương pháp xét nghiệm này chỉ có thể nhận diện được một nhóm gồm nhiều chất có cấu tạo giống nhau mà không thể xác định được đó là chất nào nồng độ từng chất riêng lẻ là bao nhiêu.

V. QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ENROFLOXACIN TRONG THỰC PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA CẠNH TRANH TRỰC TIẾP

1. Khái niệm về ELISA:

Nguyên tắc: Phương pháp ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay- xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme) có rất nhiều dạng mà đặc điểm chung là đều dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, trong đó kháng thể được gắn với một enzyme. Khi cho thêm cơ chất thích hợp (thường là nitrophenol phosphate) vào phản ứng, enzyme sẽ thủy phân cơ chất thành một chất có màu. Sự xuất hiện màu chứng tỏ đã xảy ra phản ứng đặc hiệu giữa kháng thể với kháng nguyên và thông qua cường độ màu mà biết được nồng độ kháng nguyên hay kháng thể cần phát hiện.

Phương pháp này được thiết kế cho việc phát hiện và định lượng vật chất như peptides, protein, antibodies, hormone,... Đôi khi nó còn được gọi bởi một tên gọi khác là EIA (Enzyme ImmunoAssay)

Kỹ thuật này khá nhạy và đơn giản, cho phép ta xác định kháng nguyên hoặc kháng thể ở một nồng độ rất thấp (khoảng 0,1 ng/ml). So với kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (RIA- Radio Immuno Assay) thì kỹ thuật này rẻ tiền và an toàn hơn mà vẫn đảm bảo độ chính xác như nhau. ELISA được dùng để xác định nhiều tác nhân gây bệnh như virus, vi khuẩn, nấm, ký sinh.

Kỹ thuật ELISA gồm ba thành phần tham gia phản ứng là: kháng nguyên, kháng thể và chất tạo màu; thực hiện qua hai bước:

- Phản ứng miễn dịch học: Là sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể
- Phản ứng hóa học: Thông qua hoạt tính xúc tác của enzyme làm giải phóng oxy nguyên tử [O] từ H₂O₂ để oxy hóa cơ chất chỉ thị màu, do đó làm thay đổi màu của hỗn hợp trong dung dịch thí nghiệm.

1.1. Phân loại ELISA

1.1.1. Direct ELISA (ELISA trực tiếp)

Direct ELISA: Đây là dạng đơn giản nhất của phương pháp ELISA. Trong đó, kháng nguyên cần phát hiện sẽ được gắn trực tiếp lên bề mặt giá thể và sẽ được phát hiện bằng một kháng thể duy nhất (kháng thể này đã được gắn enzyme).



Sơ đồ: Tiến trình thực hiện phản ứng ELISA trực tiếp

- Ưu điểm: Đơn giản nhất
- Nhược điểm:
 - ✓ Độ đặc hiệu bị giới hạn vì thường thì kháng nguyên có ít nhất là 2 epitope (trình diện kháng nguyên) mà phương pháp này chỉ sử dụng 1 kháng thể gắn vào một epitope.
 - ✓ Phải đánh dấu cho từng kháng thể chuyên biệt với từng đối tượng

1.1.2. ELISA gián tiếp

Indirect ELISA: Phương pháp này khác Direct ELISA ở chỗ kháng thể bắt kháng nguyên không được gắn enzyme mà nó là mục tiêu gắn đặc hiệu của một kháng thể khác (kháng thể này mới là kháng thể được gắn với enzyme).



Sơ đồ: Tiến trình thực hiện phản ứng ELISA gián tiếp

- Ưu điểm: Kháng thể gắn enzyme có thể sử dụng để đánh dấu cho nhiều loại kháng nguyên nên tiện lợi và kinh tế hơn, dễ dàng thương mại hóa.
- Nhược điểm: Độ đặc hiệu của từng kháng huyết thanh là khác nhau. Điều này dẫn đến kết quả khác nhau giữa các thí nghiệm và do đó cần phải thử nghiệm với nhiều kháng huyết thanh khác nhau để kết quả có thể tin tưởng được.

1.1.3. Sandwich ELISA

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

DAS ELISA gồm sự dính thụ động của kháng thể vào pha rắn (đáy giếng). Những kháng thể này sau đó kết hợp với các kháng nguyên được thêm vào. Những kháng nguyên được pha loãng trong blocking buffer nhằm ngăn sự dính không chuyên biệt của chúng vào pha rắn. Ở đây, những phần của blocking buffer không nên chứa bất kỳ kháng nguyên nào mà có thể kết hợp với kháng thể bắt. Sau khi ủ và rửa, chỉ còn phức hợp kháng nguyên - kháng thể dính vào pha rắn.

Kháng thể bắt sau đó được thêm vào. Do vậy, đây là sự kết hợp trực tiếp với kháng nguyên đích và kháng thể bắt. Kháng thể thứ hai này có thể giống kháng thể một hoặc khác về nguồn động vật hay loài động vật sản xuất kháng thể. Sau khi ủ, rửa, thêm cơ chất vào và đọc trên máy đo quang phổ. Vì sử dụng một kháng thể gắn kết với enzyme nên hệ thống bị giới hạn về tính chuyên biệt và những thành phần gắn liền với kháng thể chuyên biệt. Điều này giới hạn sự linh hoạt của phương pháp, ví dụ như mỗi kháng thể được sử dụng phải được đánh dấu riêng (cho những kháng nguyên khác nhau). Theo cách này, direct ELISA bị giới hạn về sự chuẩn bị kháng thể. Hệ thống cũng bị giới hạn ở chỗ kháng nguyên phải có ít nhất hai epitope vì cả hai kháng thể bắt và phát hiện đều kết hợp trực tiếp với kháng nguyên.

Kháng thể bắt trên pha rắn và kháng thể phát hiện có thể chống lại những epitope khác nhau trên phức hợp kháng nguyên. Do đó, thuận lợi khi khảo sát sự khác biệt nhỏ giữa những kháng nguyên nếu sử dụng kháng thể phát hiện và kháng thể bắt khác nhau. Việc sử dụng cùng một kháng thể bắt và phát hiện có thể dẫn đến vấn đề khi có giới hạn về vị trí gắn kết sẵn có cho sự phát hiện. Kích thước và mối quan hệ không gian của các epitope trên kháng nguyên đích là rất quan trọng và có thể ảnh hưởng mạnh đến thử nghiệm.

Sandwich ELISA có thể được chia làm hai hệ thống:

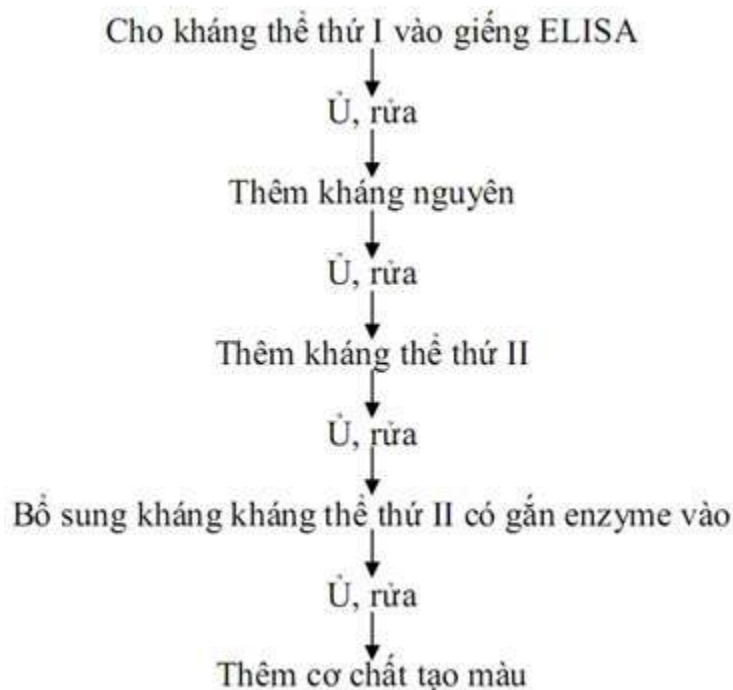
a. Sandwich ELISA trực tiếp:



Sơ đồ: Tiến trình thực hiện ELISA Sandwich trực tiếp

- Ưu điểm: Có thể phát hiện sự khác biệt nhỏ giữa các kháng nguyên nếu sử dụng kháng thể bắt và kháng thể phát hiện khác nhau.
- Chú ý: nếu sử dụng kháng thể bắt và kháng thể phát hiện giống nhau có thể dẫn đến vấn đề nếu có sự giới hạn vị trí kết hợp sẵn có để phát hiện. Mối quan hệ về kích thước và vị trí không gian của các epitope cũng có ảnh hưởng đến thử nghiệm.

b. Sandwich ELISA gián tiếp:



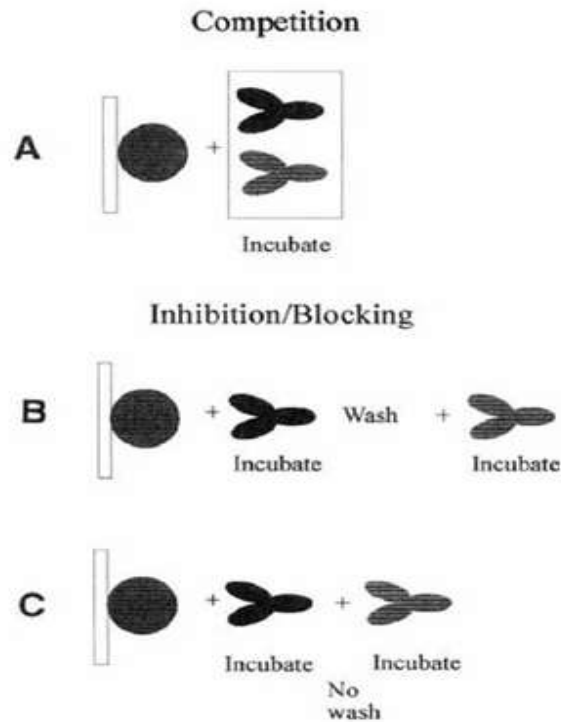
Sơ đồ: Tiến trình thực hiện phản ứng ELISA Sandwich gián tiếp

Chuyên biệt hơn Direct sandwich ELISA do antispecies kháng thể được gắn enzyme không phản ứng với kháng thể bắt kháng nguyên.

1.1.4. Phản ứng ức chế /cạnh tranh

Phản ứng cạnh tranh mang nghĩa là hai chất tham gia phản ứng cùng ái lực bắt cặp với chất thứ ba. Phản ứng cạnh tranh đúng đắn thì hai chất cạnh tranh phải được đưa vào đồng thời.

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



Hình: Sự khác biệt giữa ức chế và cạnh tranh

a. Direct C-Elisa: Kiểm tra kháng nguyên

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

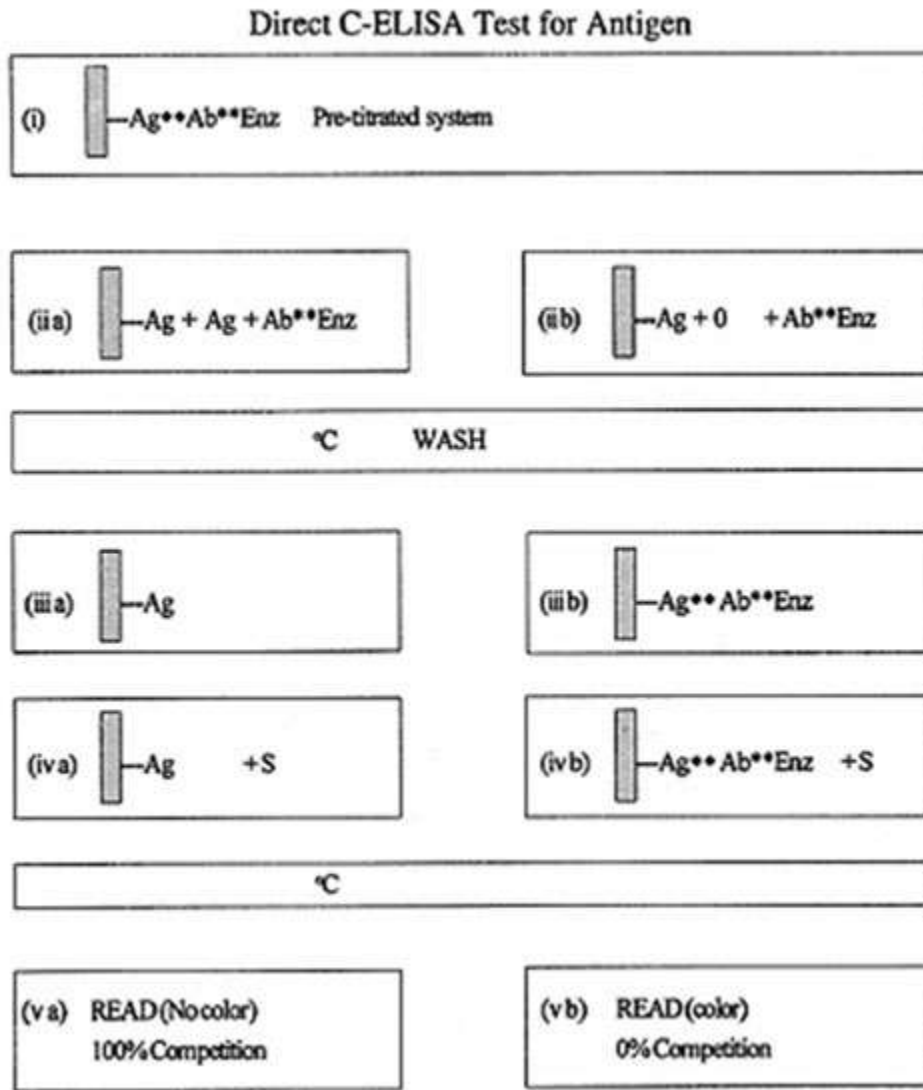
Nếu kháng nguyên tương tự hoặc cùng như kháng nguyên đã được gắn trên đĩa thì kháng thể gắn enzyme sẽ gắn lên kháng nguyên này. Khi nồng độ của kháng nguyên cạnh tranh cao sẽ ngăn cản bất kỳ sự kết hợp của kháng thể gắn enzyme với kháng nguyên trên bề mặt đĩa (cạnh tranh 100%). Nếu nồng độ kháng nguyên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

Kháng nguyên cạnh tranh có thể được thêm trực tiếp vào đĩa nếu nó được pha loãng trong blocking buffer trước khi thêm kháng thể gắn enzyme.

Mức độ cạnh tranh theo thời gian phụ thuộc vào mối tương quan của nồng độ phân tử cần kiểm tra và kháng nguyên trên bề mặt đĩa (và mức độ tương đồng của kháng nguyên).

Sau khi ủ và rửa, lượng kháng thể được đánh dấu được định lượng sau khi thêm cơ chất. khi không có kháng nguyên trong mẫu kiểm tra hay không có sự tương đồng

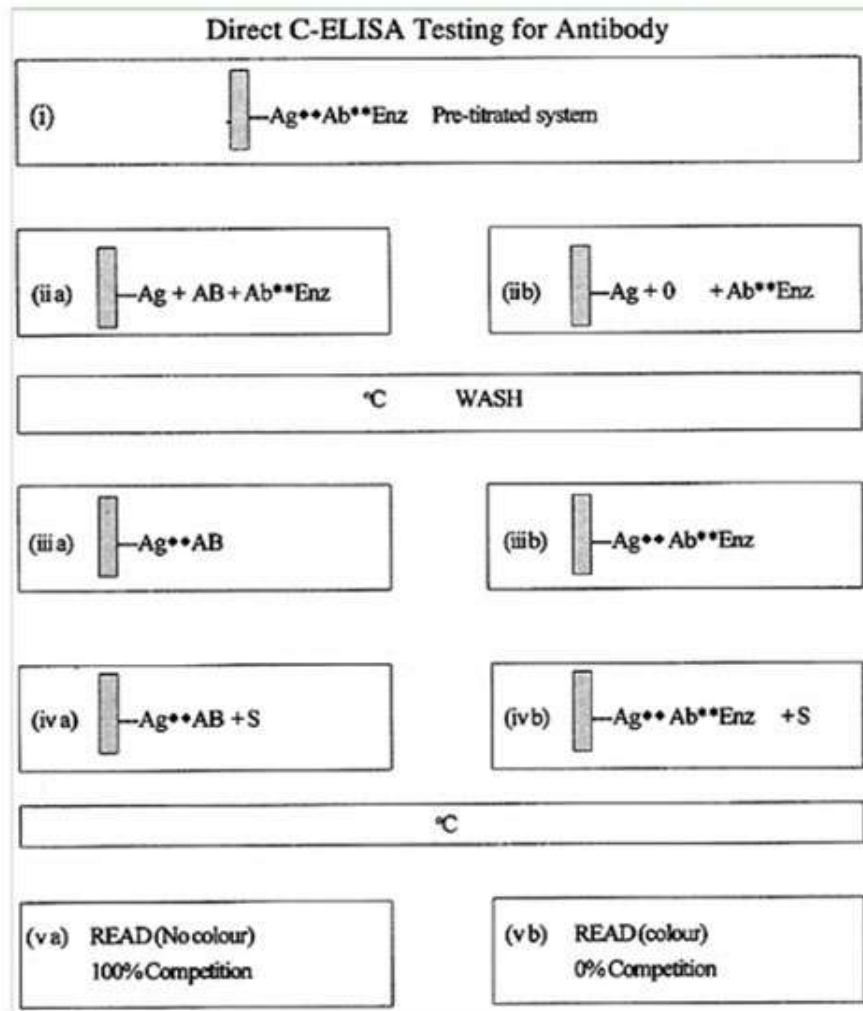
của kháng nguyên thì không có sự gắn kết với kháng nguyên được đánh dấu và không có sự cạnh tranh với kháng nguyên này. Kết quả là mẫu có chứa kháng nguyên thì sự cạnh tranh làm giảm cường độ màu còn đối chứng âm thì không.



Sơ đồ: Direct C-ELISA kiểm tra kháng nguyên

b. Direct C-Elisa: Kiểm tra kháng thể

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



Sơ đồ Direct C-ELISA kiểm tra kháng thể

1.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến độ nhạy của phản ứng ELISA

- Số lượng kháng thể thứ nhất được gắn vào đáy giếng
- Ái lực của kháng thể thứ nhất đối với kháng nguyên
- Ái lực của kháng thể thứ hai đối với kháng nguyên

1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả ELISA

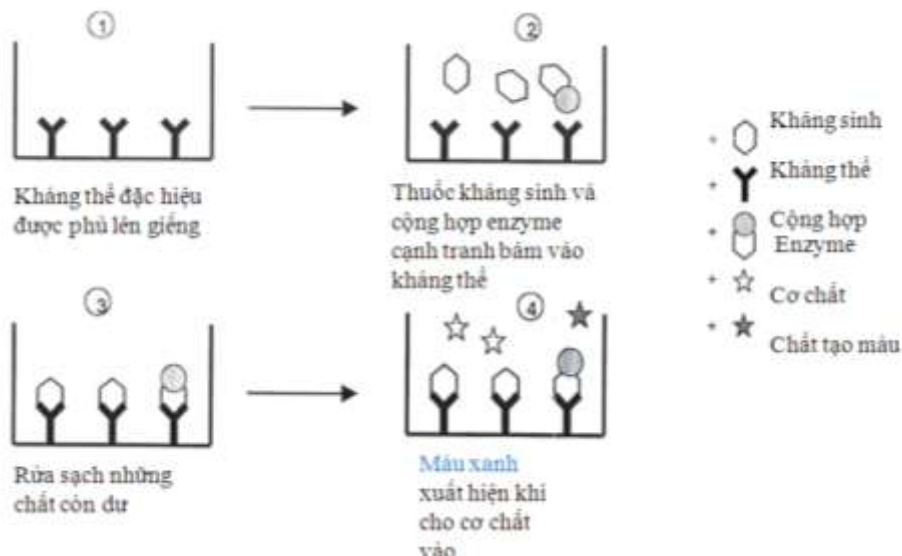
- Nếu các đối chứng âm cho kết quả dương tính thì có thể do sự nhiễm từ chất tạo màu hoặc từ kháng thể được đánh dấu hoặc chính các đối chứng bị nhiễm.

- Nếu màu không xuất hiện đối với đối chứng dương hoặc đối với mẫu thì phải kiểm tra lại tất cả hoá chất bao gồm: hạn sử dụng, nồng độ, điều kiện bảo quản.
- Nếu màu xuất hiện quá thấp đối với đối chứng dương và cả mẫu kiểm tra thì phải kiểm tra lại kháng thể được gắn enzyme và nồng độ của chất tạo màu.
- Nếu có tạo màu đối với mẫu nhưng không tạo màu với đối chứng dương thì có thể kiểm tra lại nguồn gốc đối chứng, hạn sử dụng và điều kiện bảo quản.
- Khi chạy lại một thử nghiệm trong điều kiện đang gặp sự cố thì chỉ nên thay đổi một yếu tố thí nghiệm.

2. Quy trình phân tích Enrofloxacin bằng phương pháp ELISA cạnh tranh trực tiếp

2.1. Nguyên lý:

Kháng thể đặc hiệu kháng Enrofloxacin được gắn lên giếng. Cho mẫu vào, nếu enrofloxacin có trong mẫu phân tích sẽ bị kháng thể bắt giữ, các tạp chất bị rửa trôi. Cho thêm cộng hợp giữa enrofloxacin và enzyme hiện màu vào giếng, nếu kháng thể cạnh tranh sẽ bắt giữ cộng hợp enzyme. Cộng hợp tác động lên cơ chất tạo màu xanh, nếu có enrofloxacin, cộng hợp không gắn được lên kháng thể, giếng sẽ không có màu.



Thành phần của bộ kit bao gồm:

- Các giếng phủ kháng thể
- Chứng dương, chứng âm, cộng hợp, cơ chất, dung dịch hãm màu

2.2. Các bước tiến hành:

Bước 1: Xử lý mẫu

- Cách 1: Hệ số pha loãng 3 lần
- ✓ Cho 2g mẫu vào ống ly tâm, sau đó cho thêm 4ml dung dịch methanol 70% vào
- ✓ Lắc mẫu trong 20 phút
- ✓ Ly tâm 10000 vòng/phút trong 15 phút
- ✓ Lấy 2ml dịch trong, thổi khô, sau đó hòa cạn lại bằng dung dịch methanol 35%.
Độ pha loãng: 3 lần
- Cách 2: Hệ số pha loãng 6 lần
- ✓ Cho 2g mẫu vào ống ly tâm, sau đó cho thêm 4ml dung dịch methanol 70% vào
- ✓ Lắc mẫu trong 20 phút
- ✓ Ly tâm 10000 vòng/phút trong 15 phút
- ✓ Rút 1 ml dịch trong pha loãng với 1 ml dung dịch pha loãng đi kèm.

Bước 2: Làm phản ứng ELISA

- Cho 50 μ l dung dịch chuẩn enrofloxacin và dung dịch mẫu vào mỗi giếng
- Cho 50 μ l cộng hợp enzyme vào các giếng đã cho chuẩn và mẫu
- Ủ tại nhiệt độ phòng trong 30 phút
- Rửa các giếng bằng dung dịch rửa 3 lần
- Cho 100 μ l cơ chất hiện màu vào tất cả các giếng, ủ trong 30 phút
- Để đọc mật độ quang bằng máy so màu thì cho vào mỗi giếng 50 μ l dịch hãm, hỗn hợp sẽ chuyển sang màu vàng, sau đó đọc tại bước sóng 450nm.

Cách đọc như sau:

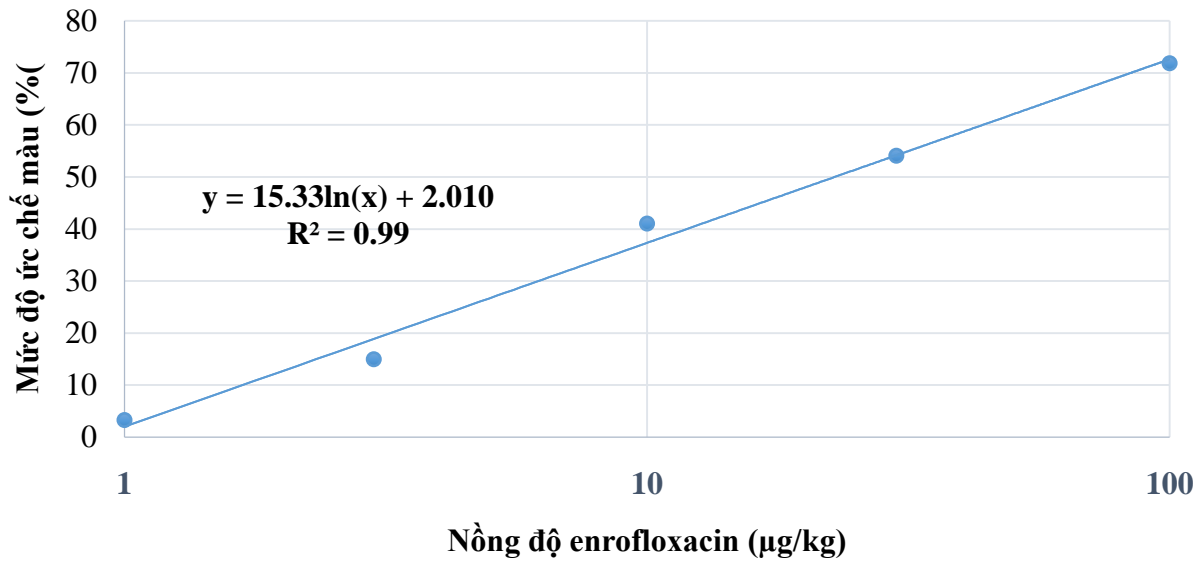
- Đối chứng dương: Màu rõ ràng, độ hấp thu ánh sáng (A) phải ≥ 0.6
- Đối chứng âm: không màu hoặc màu nhạt, độ hấp thu A phải < 0.1
- Mẫu dương tính: Có màu rõ ràng, độ hấp thu A phải ≥ 0.3

❖ Chú ý:

- Thuốc thử phải bảo quản trong lạnh (4-8⁰C)

- Khi tiến hành thí nghiệm phải đưa toàn bộ thuốc thử về nhiệt độ phòng
- Không để các thuốc thử tiếp xúc ánh nắng

Đường chuẩn ELISA phát hiện Enrofloxacin



Khảo sát độ thu hồi Enrofloxacin

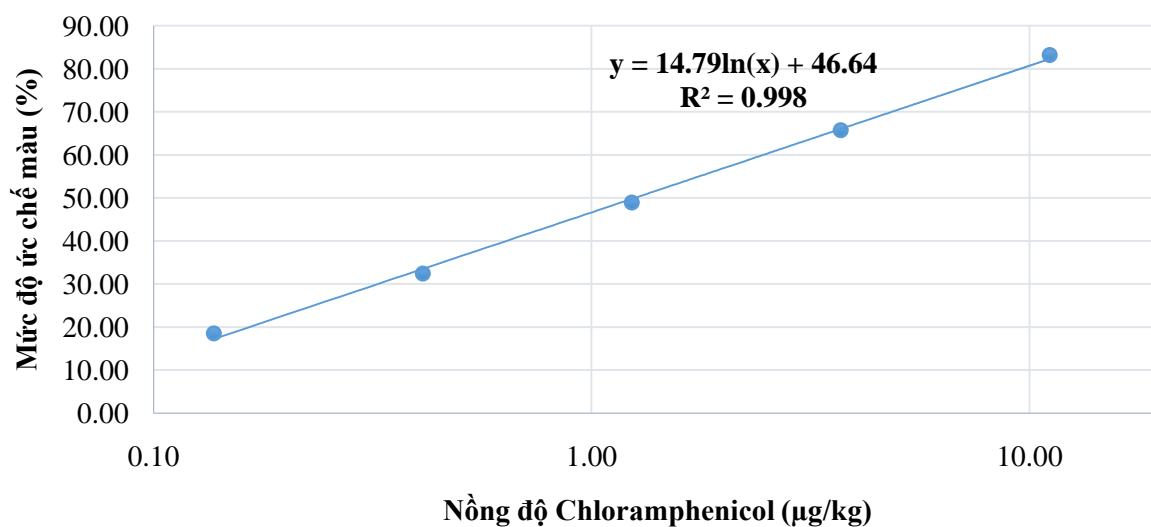
Nồng độ gây nhiễm (ppb)	Nồng độ phát hiện (ppb)	Độ thu hồi (%)
100	102	102
50	68	136
30	38	127
20	19	95
10	11	110

Kiểm tra trên mẫu thật

Mẫu	Nồng độ Enrofloxacin (ppb)
1	13.20
2	24.10
3	13.20

4	9.49
5	0
6	0
7	16.07
8	0
9	0
10	0

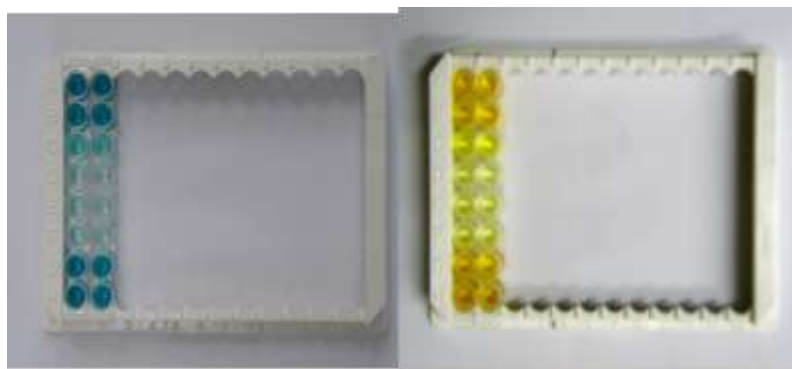
Đường chuẩn ELISA phát hiện Chloramphenicol



❖ Các sản phẩm hiện có:



Bộ kit ELISA



Kit ELISA cho biết dư lượng độ tổ có trong mẫu

❖ **Công dụng:** Xác định dư lượng chất kháng sinh Enrofloxacin, độc tố melamine trong thủy sản và sữa phù hợp với qui định về lượng tồn dư tối đa của enrofloxacin hoặc melamine trong thực phẩm

❖ **Thông số kỹ thuật:**

	Kit ELISA Enrofloxacin	Kit ELISA Chloramphenicol
Ngưỡng phát hiện ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.3	0.03
IC 50 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	10.0	1.0
Khoảng định lượng ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1 - 100	0.1 - 10

❖ **Ưu – nhược điểm của kit ELISA:**

– **Ưu điểm:**

- ✓ Nhanh
- ✓ Thao tác đơn giản, dễ thực hiện
- ✓ Không đòi hỏi thiết bị đắt tiền
- ✓ Không cần nhân viên chuyên môn cao
- ✓ Chi phí kiểm mẫu thấp do có thể kiểm đồng thời một số lượng mẫu lớn
- ✓ Một bộ kit có thể phân tích được 50-80 mẫu

– **Nhược điểm:**

- ✓ Là sinh phẩm nên một số hoá chất phải bảo quản lạnh và có hạn sử dụng nhất định
- ✓ Có độ chính xác không cao bằng các phương pháp hoá lý như phương pháp sắc ký
- ✓ Do đó thích hợp với các phân tích sàng lọc hơn là các phân tích định lượng

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. TS.Phan Văn Tiến; *Tình hình nhiễm kháng sinh trong thủy sản xuất khẩu của Việt Nam trong những năm gần đây*; 2014
2. GS.TS.Chu Phạm Ngọc Sơn; *Phân tích thuốc thú y thủy sản bằng kỹ thuật LC-MS/MS - Thuận lợi và khó khăn*; 2014
3. Trung tâm Thông tin Khoa học & Công nghệ; *Xu hướng công nghệ phân tích dư lượng kháng sinh trong thủy sản và thực phẩm trên cơ sở số liệu sáng chế quốc tế*; 2014
4. ThS. Bùi Quốc Anh; *Một số phương pháp xét nghiệm dựa trên miễn dịch*; 2014
5. ThS. Bùi Quốc Anh; *Quy trình phân tích Enrofloxacin trong thực phẩm bằng phương pháp Elisa cạnh tranh trực tiếp*; 2014
6. CN101458253 A - Phương pháp miễn dịch phát hiện dư lượng enrofloxacin trong sản phẩm thủy sản
7. CN103389378 - Bộ kit để phát hiện dư lượng kháng sinh Chloramphenicol
8. CN103018450 - Kit Elisa huỳnh quang phát hiện dư lượng kháng sinh Chloramphenicol
9. CN101639466 - Phương pháp phân tích dư lượng thuốc kháng sinh và sulfanilamide trong sản phẩm thủy sản
10. CN10264550 - Phương pháp để phát hiện dư lượng chloramphenicol, thiamphenicol, metronidazole trong tôm
11. Trang web: vasep.com.vn
12. Trang web: thuysanvietnam.com.vn
13. Trang web: vbs.ac.vn