

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ÁP DỤNG BỘ KÍT ELISA TRONG NGHIÊN CỨU TÍCH LŨY CHLORAMPHENICOL Ở TÔM BẠC *PENAEUS SETIFERUS* VÀ GHE CHẤM *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

Phạm Xuân Kỳ, Đào Việt Hà, Nguyễn Thu Hồng
Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam

Tóm tắt Để đánh giá khả năng áp dụng một bộ kit ELISA thương mại trong xác định hàm lượng chloramphenicol (CAP) ở các đối tượng thủy sản, một số thông số cơ bản của phương pháp như tỷ lệ gắn kết giữa CAP đánh dấu enzym và kháng thể (B/Bo, %), giới hạn nồng độ phát hiện, hệ số biến thiên (CV) trên cùng bản sử dụng mẫu chiết tôm bạc *Penaeus setiferus* và ghe chấm *Portunus trituberculatus* bị nhiễm CAP đã được tính toán. Trên cơ sở đó, chúng tôi đã ứng dụng bộ kit để nghiên cứu sự tích lũy và đào thải CAP trong tôm và ghe được tiêm CAP hoặc ngâm trong nước biển chứa CAP trong 24 giờ. Các kết quả đã cho thấy bộ kit ELISA (Maxsignal™, Bioo Scientific Corp.) có thể phát hiện một hàm lượng rất thấp CAP trong các đối tượng thí nghiệm (0,025 ng/g ở tôm và 0,1 ng/g ở ghe) với sai số thấp (CV: 3-5% ở mẫu tôm và 10% ở mẫu ghe). Cả tôm và ghe thí nghiệm đều có xu hướng tích lũy CAP trong suốt 24 giờ ngâm trong nước biển chứa CAP. Bước đầu cũng cho thấy tôm có thể đào thải một hàm lượng nhất định CAP ở điều kiện nuôi không chứa CAP (từ 5,53 µg/g sau 1 giờ còn 3,18 µg/g sau 24 giờ khi tiêm CAP).

EVALUATING THE POTENTIAL APPLICATION OF ELISA KIT FOR DETECTION OF CHLORAMPHENICOL IN WHITE SHRIMP *PENAEUS SETIFERUS* AND HORSE CRAB *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

Pham Xuan Ky, Dao Viet Ha, Nguyen Thu Hong
Institute of Oceanography, Vietnam Academy of Science & Technology

Abstract To evaluate a commercial ELISA kit for detecting chloramphenicol (CAP) in seafood, several basic parameters of method, including the binding rate between enzyme labeled-CAP and antibody (B/Bo, %), detection limit, inter-assay coefficient of variation (CV) using the CAP extracts from white shrimp *Penaeus setiferus* and horse crab *Portunus trituberculatus* have been determined. Based on this result, we applied the kit to investigate the accumulation and elimination of CAP in these species which were injected with CAP solution or captured in filtered seawater with CAP for 24 hours. The results showed that the ELISA kit (Maxsignal™, Bioo Scientific Corp.) can detect a very low level of CAP in experimental samples (0.025 ng g⁻¹ in white shrimp and 0.1 ng g⁻¹ in horse crab) with CV 3-5% in white shrimp and 10% in horse crab's samples. Both white shrimp and horse crab tended to accumulate CAP during 24 hours in CAP-seawater. As initial result, CAP-contaminated white shrimp in seawater without CAP could eliminate a certain amount of contaminated CAP (from 5.53 µg g⁻¹ at 1 hour to 3.18 µg g⁻¹ at 24 hours after inoculation).

I. MỞ ĐẦU

Chloramphenicol (CAP) là một loại kháng sinh phổ rộng (Parfitt, 1999) được dùng trong phòng và điều trị một số bệnh do vi khuẩn (Pathak và cs., 2000). Tuy nhiên, CAP tích lũy trong mô của vật nuôi có thể gây ra các bệnh nguy hiểm ở người như sự ngừng phát triển của tủy xương hoặc bệnh bạch cầu cấp tính nếu dùng đôi tượng bị nhiễm làm thức ăn trong một thời gian dài (Lafarge-Frayssinet và cs., 1994; Robbana-Barnat và cs., 1997). Do đó, loại kháng sinh này đã được đưa vào danh mục khuyến cáo cấm sử dụng. Mặc dù vậy, cũng như các nước đang phát triển khác ở Việt Nam, CAP vẫn còn được dùng một cách không chính thức trong phòng trị bệnh một số loài thủy sản nuôi vì hóa chất này có giá thành rẻ và khá hiệu quả. Trong thực tế, kiểm soát việc sử dụng chất này trong nuôi thủy sản vẫn còn khá khó khăn. Những năm qua, sản lượng thủy sản xuất khẩu của nước ta tăng mạnh nhưng về chất lượng vẫn còn tồn tại một số vấn đề về tiêu chuẩn an toàn thực phẩm, đặc biệt là dư lượng kháng sinh. Điều này đã làm giảm giá trị của một số mặt hàng thủy sản, dẫn đến việc tăng nguy cơ bị cấm nhập các sản phẩm này từ một số quốc gia. Vì vậy, việc tìm kiếm phương pháp kiểm tra nhanh, nhạy, tin cậy và có giá thành rẻ các dư lượng kháng sinh trong sản phẩm thủy sản là cần thiết.

Hiện nay, các phương pháp như sắc ký khí (GC), sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp với khối phổ (LC/MS), von-ampe... đã được áp dụng để xác định một số loại kháng sinh, trong đó có CAP (Harvey, 2000; Alemu và Hlalele, 2007). Tuy nhiên, việc sử dụng những kỹ thuật này ở các cơ sở chế biến trong nước còn rất hạn chế do đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền cũng như trình độ chuyên môn cao của người sử dụng. Gần đây, các kỹ thuật mới đơn giản hơn như thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn kết enzym (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) đã được dùng để phát hiện hàm lượng một số loại kháng sinh trong sản phẩm nuôi. Phương pháp này đã được áp dụng để xác định hàm lượng CAP trong tôm sú *Penaeus*

monodon ở Thái Lan (Raffi và Suresh, 2011). Nó có thể được thực hiện ở những phòng thí nghiệm không quá hiện đại và có nhiều ưu điểm so với các phương pháp đã nêu như tiết kiệm thời gian (chỉ mất khoảng 2-3 giờ và tiến hành phân tích được nhiều mẫu cùng lúc) và trang thiết bị không quá đắt (chỉ cần một máy đo quang phổ), nhờ đó có thể giảm giá thành phân tích.

Nhiều đối tượng thủy sản như tôm, cua, cá, mực... được phát hiện có khả năng tích lũy CAP trong cơ thể. Trong phạm vi khảo sát, chúng tôi sử dụng tôm bạc *Penaeus setiferus* và ghẹ chám *Portunus trituberculatus* để nghiên cứu. Đây là những đối tượng thủy sản có giá trị thương mại cho tiêu thụ nội địa và xuất khẩu. Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng áp dụng của một bộ kit ELISA thương mại trong xác định sự tích lũy hàm lượng CAP ở một số đối tượng thủy sản, cụ thể là tôm và ghẹ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Mẫu vật

Tôm bạc nuôi *Penaeus setiferus* (khối lượng cơ thể 7,85 - 15,15 g, n=50) và ghẹ chám *Portunus trituberculatus* (khối lượng cơ thể 54,76 - 74,81 g, n=30) đạt kích cỡ thương phẩm được mua năm 2009 từ cơ sở thu mua hải sản tại Nha Trang. Các mẫu vật này được vận chuyển sống về phòng thí nghiệm và nuôi giữ trong nước biển lọc qua màng lọc sinh học có sục khí trong khoảng 3 giờ nhằm ổn định tình trạng sức khỏe. Sau đó, 04-05 cá thể của từng loài tôm và ghẹ được thu như là mẫu đối chứng để kiểm tra hàm lượng CAP. Các cá thể còn lại của mỗi loài được sử dụng cho các thí nghiệm khác nhau.

2. Bố trí các thí nghiệm

2.1. Đào thải CAP ở tôm

- Thí nghiệm 1:

Để tìm hiểu sự đào thải CAP ở tôm, 20 cá thể tôm bạc được tiêm dung dịch CAP (Khapharco) pha trong nước cất với nồng độ 1.000 ppm với liều tiêm là 0,5 ml/cá thể,

tương đương với 500 µg CAP/cá thể. Các cá thể sau khi tiêm được nuôi trong nước lợ hay nước biển đã lọc không chứa CAP có thể tích 10 lít, sục khí, không cho ăn. Mỗi lô gồm 5 cá thể được thu sau 1, 6 và 24 giờ.

2.2. Tích lũy CAP ở tôm và ghẹ

Các thí nghiệm 2-5 được tiến hành để tìm hiểu khả năng tích lũy CAP ở tôm và ghẹ ngâm trong nước lợ hoặc nước biển chứa CAP với các nồng độ ban đầu khác nhau.

- Thí nghiệm 2:

Tôm bạc được ngâm trong nước lợ chứa CAP ở nồng độ 50 ppm, 250 g tôm/5 lít, sục khí. Mỗi lô gồm 5 cá thể được thu sau 6 và 24 giờ.

- Thí nghiệm 3:

Tôm bạc được ngâm trong nước lợ chứa CAP ở nồng độ 100 ppm, 250 g tôm/5 lít, sục khí. Mỗi lô gồm 5 cá thể được thu sau 6 và 24 giờ.

Các thí nghiệm trên được tiến hành đồng thời trong môi trường nước có độ mặn 10 ppt, pH 6,5 và nhiệt độ 27°C.

- Thí nghiệm 4:

Ghẹ chám được ngâm trong nước biển chứa CAP ở nồng độ 50 ppm, 300 g ghẹ/5 lít, sục khí. Mỗi lô gồm 4 cá thể được thu sau 6 và 24 giờ.

- Thí nghiệm 5:

Ghẹ chám được ngâm trong nước biển chứa CAP ở nồng độ 100 ppm, 300 gam ghẹ/5 lít, sục khí. Mỗi lô gồm 4 cá thể được thu sau 6 và 24 giờ. Môi trường nước ở các thí nghiệm 4 và 5 có độ mặn 35 ppt, pH 6 và nhiệt độ 30,4°C.

Các mẫu tôm và ghẹ đối chứng được xem như là các mẫu thu ở 0 giờ đối với các thí nghiệm ngâm trong dung dịch CAP.

Các nồng độ CAP được sử dụng trong các thí nghiệm trên dựa theo thông tin thực tế CAP thường sử dụng trong phòng trị bệnh đối tượng thủy sản.

Trong thời gian thí nghiệm, các đối tượng nuôi trên không được cho ăn. Các yếu tố môi trường nuôi được đo ở điều kiện thực tế.

Các cá thể tôm và ghẹ sau khi thu được cân khối lượng, đựng trong các túi nhựa riêng.

2.3. Chiết rút Chloramphenicol (CAP)

Sau khi lột bỏ vỏ, phần cơ được sử dụng để chiết rút CAP.

03g mẫu đã làm nhuyễn được chiết với 6 ml ethyl acetate (Prolabo, CE, P.A) và ly tâm (10.000 vòng/phút) trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, thu dịch trong. Tiếp theo, chuyển 4 ml dịch chiết vào bình thủy tinh và làm khô trên máy cô chân không (Laborota 4000, Heidolph, Đức) ở 70°C. Hòa tan cặn mẫu sau khi cô chân không với 2 ml dung dịch n-hexane (Merk, P.A) và 1 ml đệm chiết 1x (Maxsignal™) trong 2 phút. Ly tâm (10.000 vòng/phút) trong 5 phút, loại bỏ lớp hexane (lớp trên) và thu phần đệm chiết có chứa CAP (lớp dưới). Mẫu được giữ ở -30°C đến khi phân tích ELISA.

Mẫu trắng cũng được chiết theo quy trình trên chỉ với dung môi. Hiệu suất chiết CAP từ các mẫu nghiên cứu theo quy trình đạt khoảng 80% theo nhà sản xuất.

2.4. Thực hiện phương pháp ELISA

Bộ kit ELISA (Maxsignal™) để phân tích CAP được cung cấp bởi công ty Bioo Scientific Corp. (Catalog No: 1013; lot No: 101303020508\$5085350659). Phương pháp dựa trên phản ứng cạnh tranh kháng nguyên- kháng thể (Mikkelsen và Eduador, 2004). Các giếng được phủ bởi một số lượng có hạn các kháng thể bắt giữ trực tiếp CAP. CAP trong mẫu chuẩn hoặc mẫu chiết và CAP đánh dấu bằng enzyme (CAP-horseradish peroxidase, HPR) cạnh tranh các vị trí gắn kết của kháng thể trong các giếng. Kết quả là cường độ màu sau khi thêm chất nền (tetramethylbenzidine, TMB) cho phản ứng enzyme sẽ tỷ lệ nghịch với hàm lượng CAP trong mẫu.

- Các bước tiến hành:

80 µl mỗi mẫu CAP chuẩn (0,05; 0,15; 0,5; 1,5 và 4,5 ng/mL trong dung dịch đệm 1x) và mẫu nghiên cứu được thêm vào giếng đã phủ sẵn kháng thể CAP, mỗi mẫu 2 giếng. Thêm vào mỗi giếng 80 µl của dung dịch 1x CAP-HRP, lắc nhẹ trong 1

phút, sau đó ủ trong vòng 1 giờ ở điều kiện tránh ánh sáng và nhiệt độ 25°C. Rửa mẫu 3 lần bằng dung dịch rửa 20x (250 µl/giếng). Tiếp đến, thêm 100 µl TMB vào các giếng và lắc nhẹ trong 1 phút, ủ 20 phút, ở điều kiện tránh ánh sáng và nhiệt độ 25°C. Sau khi ủ, thêm vào mỗi giếng 100 µl dung dịch H₂SO₄ 1N để ngừng phản ứng enzyme. Mật độ quang (OD) được đọc bởi

$$B/B_0(%) = \frac{\text{Mật độ quang hấp phụ của chuẩn (mẫu) - mẫu trắng}}{\text{Mật độ quang hấp phụ của mẫu zero - mẫu trắng}}$$

Xác định giới hạn nồng độ phát hiện CAP của mẫu chiết tôm, ghẹ: mẫu được pha loãng thành một dãy nồng độ khác nhau với độ pha loãng 3 lần. Giới hạn phát hiện được tính ở nồng độ nhỏ nhất mà mật độ quang gần bằng với mẫu zero (đệm 1x).

Tính toán hệ số biến thiên CV (thể hiện sự chênh lệch giữa độ lệch chuẩn và giá trị trung bình) trên cùng bản: sử dụng cùng một nồng độ CAP của chất chiết tôm hoặc ghẹ trong một số giếng.

2.5. Xử lý số liệu

Sự sai khác về khối lượng của các cá thể tôm và ghẹ giữa các thí nghiệm, hàm lượng CAP trong tôm tiêm ở 1, 6 và 24 giờ, tôm và ghẹ ngâm ở các nồng độ khác nhau được kiểm tra bằng phép phân tích phương sai một chiều (ANOVA) và Tukey test. Sự sai khác về hàm lượng CAP của tôm và ghẹ ngâm ở 6 và 24 giờ được kiểm tra bằng Student's t-test. Mức sai khác có ý nghĩa được xem xét ở P < 0,05.

III. KẾT QUẢ

1. Một số thông số của ELISA

Tỷ lệ B/B₀, đường biểu diễn và phương trình tuyến tính của các đường thẳng này ở mẫu chuẩn và tôm thí nghiệm; mẫu chuẩn và ghẹ thí nghiệm lần lượt được trình bày trong các Hình 1a, b. Đường thẳng và phương trình tuyến tính thể hiện mối quan hệ giữa mật độ quang và nồng độ CAP của dãy mẫu chuẩn được trình bày trong Hình 1c.

máy quang phổ kế (Bio-Rad, model 680) ở bước sóng 450 nm. Hàm lượng CAP trong mẫu được tính toán dựa trên phương trình thể hiện mối quan hệ giữa mật độ quang và nồng độ CAP của dãy chuẩn.

Một số thông số của ELISA:

Tỷ lệ gắn kết giữa CAP đánh dấu enzyme và kháng thể được xác định như sau:

Ở mẫu tôm, nồng độ nhỏ nhất (giới hạn phát hiện) có thể phát hiện là 0,025 ng/g, còn ở mẫu ghẹ là 0,1 ng/g. Giá trị CV trên cùng bản ở cùng nồng độ của mẫu tôm thay đổi từ 3-5% và mẫu ghẹ là 10% (n=4).

2. Hàm lượng CAP ở tôm và ghẹ thí nghiệm

Không có sự khác biệt về trọng lượng giữa các cá thể tôm và ghẹ dùng cho các thí nghiệm.

Đối chứng (mẫu 0 giờ): Hàm lượng CAP trung bình của mẫu đối chứng tôm là 0,37 ng/g và mẫu đối chứng ghẹ là 0,15 ng/g.

Thí nghiệm 1: hàm lượng CAP của tôm giảm đáng kể (P < 0,05) ở 24 giờ sau khi tiêm (trung bình 5,53 - 5,35 - 3,18 µg/g ở 1, 6 và 24 giờ, lần lượt) (Hình 2a).

Thí nghiệm 2: không có khác biệt đáng kể hàm lượng CAP trong tôm ở 6 giờ và 24 giờ (trung bình 46,42 và 46,94 ng/g) (Hình 2b).

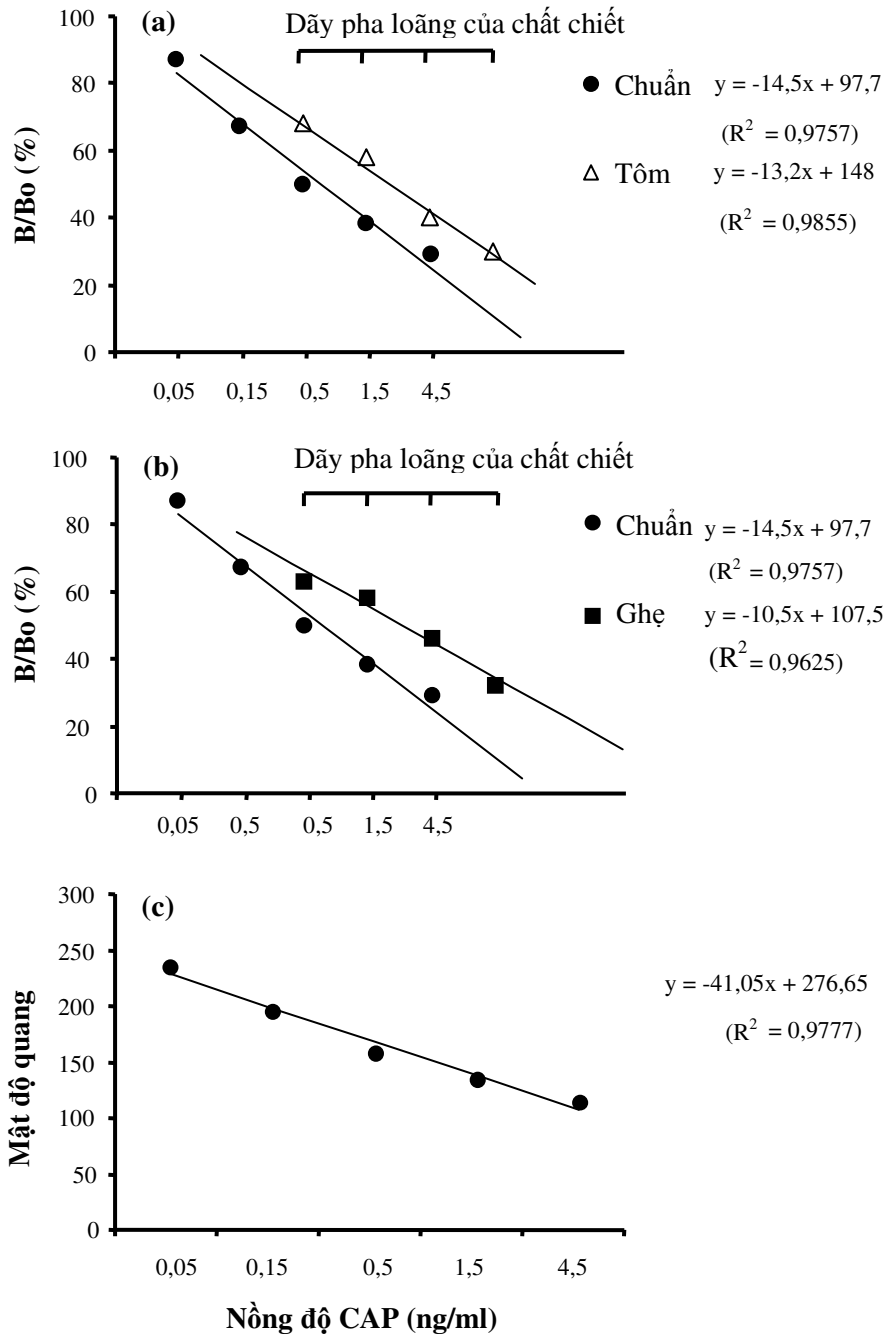
Thí nghiệm 3: hàm lượng CAP trong tôm mặc dù có xu hướng tăng nhẹ nhưng không khác biệt đáng kể ở 6 giờ và 24 giờ (trung bình 47,82- 48,77 ng/g) (Hình 2c).

Không có khác biệt đáng kể về hàm lượng CAP tích lũy trong tôm ngâm ở các nồng độ CAP 50 ppm và 100 ppm ở các thời gian thí nghiệm.

Thí nghiệm 4: không có khác biệt đáng kể về hàm lượng CAP trung bình trong ghẹ ở 6 giờ (55,21 ng/g) và 24 giờ (56,36 ng/g) (Hình 3a).

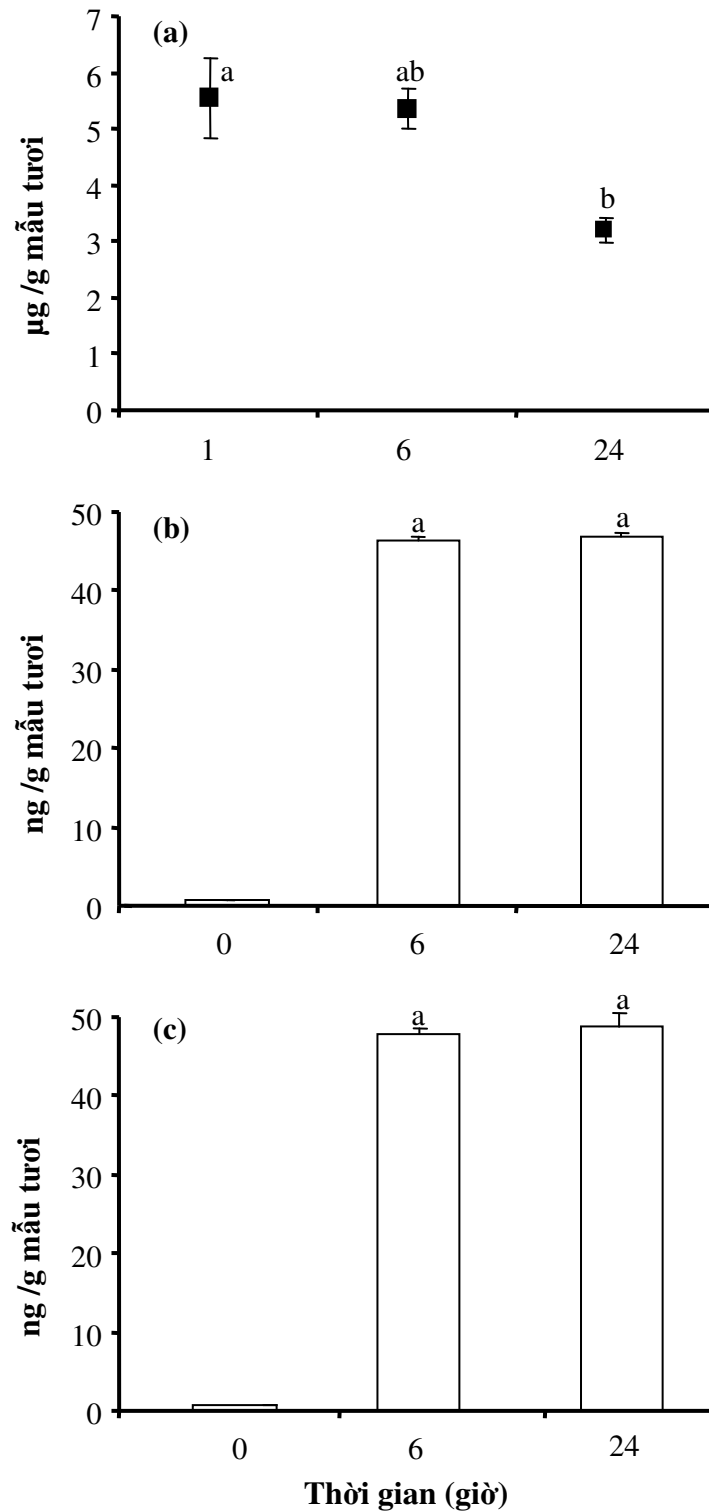
Thí nghiệm 5: hàm lượng CAP trung bình trong ghẹ ở 6 giờ (56,80 ng/g) và 24 giờ (67,75 ng/g) có xu hướng tăng nhẹ (Hình 3b).

Hàm lượng CAP tích lũy trong ghẹ ngâm ở các nồng độ CAP 50 ppm và 100 ppm ở các thời điểm thu mẫu cũng không khác biệt đáng kể ($P > 0,05$).



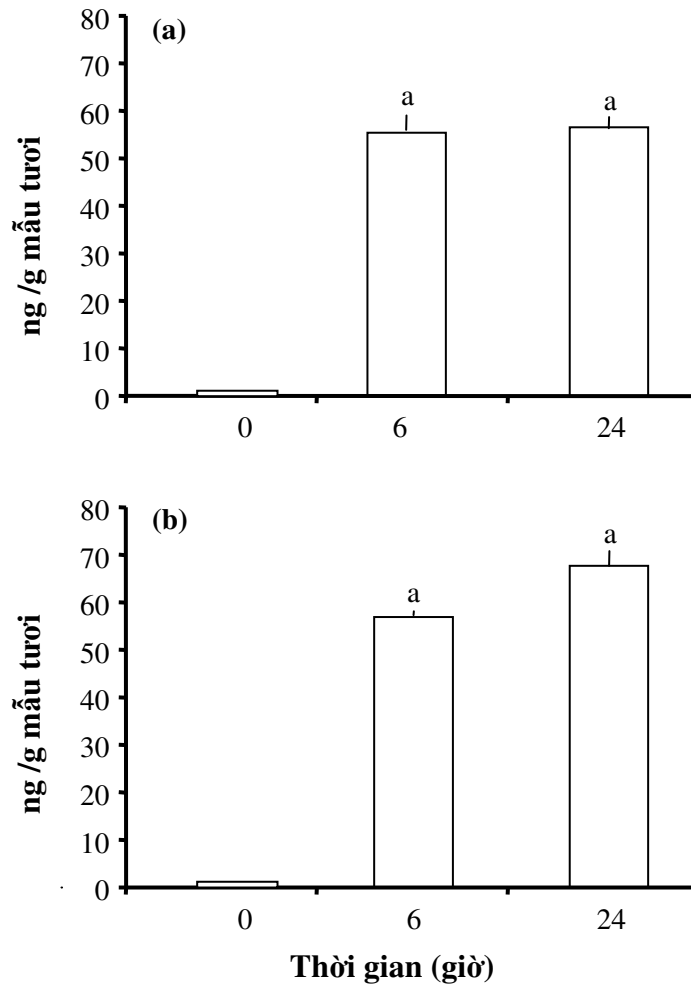
Hình 1. Đường biểu diễn tuyến tính tỷ lệ B/Bo trong (a) mẫu CAP chuẩn và tôm, (b) mẫu CAP chuẩn và ghẹ và (c) quan hệ giữa mật độ quang ở bước sóng 450 nm và nồng độ của mẫu CAP chuẩn

Figure 1. Corresponding parallelisms of B/Bo in (a) CAP standard and shrimp extracts, (b) CAP standard and horse crab extracts and (c) the relationship between optical density at 450 nm and CAP standard concentration



Hình 2. Hàm lượng CAP của (a) tôm tiêm CAP, (b) tôm ngâm trong nước biển chứa CAP ở nồng độ 50 ppm, (c) tôm ngâm trong nước biển chứa CAP ở nồng độ 100 ppm trong 24 giờ. Các ký tự khác nhau chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$)

Figure 2. The CAP concentration of (a) shrimp injected with CAP, (b) shrimp captured in seawater with CAP at 50 ppm, (c) shrimp captured in seawater with CAP at 100 ppm for 24 hours. Different letters indicate a significant difference in mean values ($p < 0.05$).



Hình 3. Hàm lượng CAP trong (a) mẫu ghẹ ngậm trong nước biển chứa CAP ở nồng độ 50 ppm, (b) mẫu ghẹ ngậm trong nước biển chứa CAP ở nồng độ 100 ppm trong 24 giờ
Figure 3. The CAP concentration of (a) horse crab captured in seawater with CAP at 50 ppm, (b) horse crab captured in seawater with CAP at 100 ppm for 24 hours

IV. THẢO LUẬN

Tỷ lệ gắn kết B/Bo và nồng độ của dãy mẫu chuẩn cũng như các mẫu nghiên cứu có mối tương quan chặt chẽ. Trong dãy nồng độ nghiên cứu, đường thẳng thể hiện mối tương quan giữa tỷ lệ gắn kết B/Bo và nồng độ CAP ở mẫu tôm song song với đường chuẩn. Điều đó cho thấy rằng, dịch chiết CAP của mẫu tôm là không chứa những tạp chất có thể gây ảnh hưởng đến phản ứng ELISA. Mặt khác giá trị CV trên cùng bản của cùng một nồng độ mẫu tôm nằm trong giới hạn CV của mẫu chuẩn được xác lập bởi nhà sản xuất (3-5%). Thêm vào đó, nồng độ nhỏ nhất của CAP có thể phát hiện

trong mẫu tôm cũng khá thấp, tương đương với giới hạn phát hiện của phương pháp sắc ký khí (Son, 2002; Gantverg và cs., 2003), nhỏ hơn ngưỡng an toàn sử dụng (0,1 ppb). Xem xét tất cả các thông số trên, có thể kết luận rằng bộ kit ELISA trong nghiên cứu này đủ độ tin cậy trong xác định hàm lượng CAP trong mẫu tôm.

Đối với mẫu ghẹ, đường thẳng thể hiện mối tương quan giữa tỷ lệ gắn kết và nồng độ CAP ở mẫu ghẹ được thiết lập qua toàn bộ dãy nồng độ nghiên cứu không song song với đường chuẩn. Giá trị CV trên cùng bản của cùng một nồng độ mẫu ghẹ mặc dù vẫn nằm ở sai số cho phép nhưng lớn hơn CV của mẫu chuẩn. Nồng độ nhỏ nhất của

CAP có thể phát hiện trong mẫu ghẹ là cao hơn tôm nhưng bằng với ngưỡng an toàn sử dụng (0,1 ppb). Có thể do trong dịch chiết mẫu ghẹ chứa một số protein hoặc một số chất gây ức chế hoặc cạnh tranh các vị trí gắn kết với các kháng thể CAP trong các phản ứng của quá trình ELISA. Điều này có thể dẫn đến những phản ứng dương tính giả ở một số mẫu thử. Kết quả này góp phần giải thích vì sao tỷ lệ dương tính giả của mẫu ghẹ lớn hơn mẫu tôm khi sử dụng ELISA được kiểm tra bằng LC-MS/MS (Nguyễn Anh Dũng và cs., 2010). Tuy nhiên, khi xem xét mối tương quan giữa tỷ lệ gắn kết B/Bo và nồng độ ở mẫu ghẹ ở dãy nồng độ lớn hơn (từ 0,15 ng/ml đến 5 ng/ml) thì đường thẳng này ($y = -13x + 97,333$, $r^2 = 0,998$) song song với đường chuẩn. Như vậy, khi sử dụng nồng độ mẫu ghẹ phân tích nằm trong dãy thích hợp (từ 0,15 ng/ml đến 5 ng/ml) thì hàm lượng CAP sẽ được xác định một cách chính xác hơn.

Cả tôm và ghẹ nuôi đều có xu hướng tích lũy CAP trong cơ thể suốt 24 giờ ngâm trong nước biển chứa CAP. Hàm lượng CAP trong tôm và ghẹ gia tăng không đáng kể theo thời gian thí nghiệm đã cho thấy rằng cả tôm và ghẹ đều tích lũy chậm CAP và thời gian của pha tích lũy có thể kéo dài. Sự không khác biệt lớn về hàm lượng CAP trong cả tôm và ghẹ ngâm ở môi trường nước với các nồng độ khác nhau gợi ý rằng nồng độ CAP cao trong môi trường nuôi không ảnh hưởng nhiều đến tốc độ tích lũy trong thời gian đầu của pha hấp thu. Kết quả từ mẫu tôm tiêm CAP cho thấy tôm có thể đào thải CAP trong một thời gian nhất định ở môi trường nuôi không chứa CAP. Tuy nhiên thời gian của pha tích lũy và thời gian để tôm thải loại CAP hoàn toàn hoặc đến mức thấp nhất cần được tiếp tục nghiên cứu. Một số nghiên cứu cho thấy sự tích lũy và đào thải kháng sinh có thể phụ thuộc vào loại kháng sinh, cách thức mà cá thể tiếp nhận kháng sinh và từng loài sinh vật khác nhau. Ở loài tôm trắng *Litopenaeus vannamei*, sự tích lũy oxytetracycline (OTC) khác nhau ở các bộ phận và thời gian đạt

đến giá trị cực đại cũng khác nhau; ở tuyến tiêu hóa (hepatopancreas) là 2 ngày, cơ và huyết dịch (hemolymph) là 8 ngày trong suốt 14 ngày cho ăn (Gómez-Jimenez và cs., 2008). Hàm lượng OTC dưới ngưỡng phát hiện (0,01 $\mu\text{g/g}$) sau 6 ngày ở huyết dịch và tuyến tiêu hóa, sau 8 ngày ở cơ sau khi ngừng cho ăn khẩu phần chứa OTC (Gómez-Jimenez và cs., 2008). Ở hải sâm biển *Psammechinus miliari*, OTC tích lũy trong tuyến sinh dục theo thời gian cho ăn thức ăn chứa kháng sinh trong suốt 12 ngày thí nghiệm và thời gian đào thải một nửa ($t_{1/2}$) lượng kháng sinh từ cơ quan này là 24,6 ngày (ở nhiệt độ 11-13°C) sau khi ngừng cung cấp OTC (Campbell và cs., 2002). Đối với CAP, thời gian đào thải một nửa ($t_{1/2}$) hàm lượng ở loài tôm *Penaeus chinensis* là 10,04 giờ, sulphamethoxazole (SMZ) là 5,68 giờ, OTC là 16,12 giờ (Wang và cs., 2004). Ngoài ra có thể điều kiện môi trường cũng đóng vai trò quan trọng trong đào thải, đặc biệt là các điều kiện lý hóa như pH, nhiệt độ, độ mặn... (Björklund và Bylund, 1990; Haug và Arnt, 2000). Sự tích lũy và đào thải CAP và các loại kháng sinh khác ở tôm và các động vật thủy sản khác trong các điều kiện nuôi khác nhau nên cần được quan tâm nghiên cứu sâu hơn.

Tóm lại, bộ kit ELISA dùng để xác định hàm lượng CAP ở tôm và ghẹ trong nghiên cứu này có độ nhạy và độ ổn định cao. Mặc dù, nó có thể ứng dụng để xác định hàm lượng CAP ở các đối tượng khác nhau theo nhà sản xuất nhưng cần kiểm tra các thông số cơ bản khi tiến hành ELISA trên mẫu của từng đối tượng cụ thể. Tôm bạc và ghẹ chàm có khả năng tích lũy CAP trong cơ thể khi được ngâm trong nước biển chứa CAP và tôm có khả năng đào thải CAP trong môi trường nuôi không chứa CAP.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alemu H. and L. Hlalele, 2007. Voltammetric determination of chloramphenicol at electrochemically pretreated glassy carbon electrode. Bull. Chem. Soc. Ethiop, 21: 1-12.

- Björklund H. V. and G. Bylund, 1990. Temperature related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout *Salmo gairdneri* R. *Aquaculture*, 84: 363-372.
- Campbell D. A., P. Pantazis, and M. S. Kelly, 2002. Impact and residence time of oxytetracycline in the sea urchin, *Psammechinus miliaris*, a potential aquaculture species. *Aquaculture*, 202: 73-87.
- Gantverg A., I. Shishani and M. Hoffman, 2003. Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 483: 125-135.
- Gómez-Jimenez S., A. Espinosa-Plascencia, F. Valenzuela-Villa and M. D. C. Bermudez-Almada, 2008. Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in hemolymph, muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following an OTC-feed therapeutic treatment. *Aquaculture*, 274: 24-29.
- Harvey D., 2000. Modern analytical chemistry, the 2nd ed., McGraw-Hill, USA, 816 pp.
- Haug T. and H. P. Arnt, 2000. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Arctic charr *Salvelinus alpinus* L in freshwater at low temperature. *Aquaculture*, 186: 175-191.
- Lafarge-Frayssinet C., S. Robbana-Barnat, C. Frayssinet, L. Toucas and F. Decloitre, 1994. Cytotoxicity and DNA damaging potency chloramphenicol and six metabolites: a new evaluation in human lymphocytes and Raji cells. *Mutat. Res.*, 320: 207-215.
- Mikkelsen R. S. and C. Eduardo, 2004. *Bioanalytical Chemistry*. Wiley-Interscience, 375 pp.
- Nguyễn Anh Dũng, Trần Đăng Ninh, Nguyễn Tử Cương, 2010. Đánh giá kết quả thí nghiệm dư lượng chloramphenicol trong thủy sản bằng kit Elisa thông qua phân tích khẳng định bằng LC-MS/MS. [Vinalab.org.vn/files/baocao1\(hn2\).doc](http://Vinalab.org.vn/files/baocao1(hn2).doc).
- Parfitt K., 1999. *Martindale: The Complete Drug Reference*, the 32nd Ed., London: Pharmaceutical Press, pp. 182-184.
- Pathak S. C., S. K. Ghosh and K. Palanisamy, 2000. The use of chemicals in aquaculture in India. In: Arthur J. R., Lavilla-Pitogo C. R., Subasinghe R. P. (eds), *Use of chemicals in aquaculture in Asia*, Philippines, pp. 87-112.
- Raffi S. M. and T. V. Suresh, 2011. Screening of chloramphenicol in wild and cultured shrimp *Penaeus monodon* by competitive enzyme linked immunosorbent assay. *International Conference on Chemical, Biological and Environment Sciences (ICCEBS'2011)* Bangkok. Pages: 313-317.
- Robbana-Barnat S., F. Decloitre, C. Frayssinet, J. M. Seigneurin, L. Toucas and C. Lafarge-Frayssinet, 1997. Use of human lymphoblastoid cells to detect the toxic effect of chloramphenicol and metabolites possibly involved in aplastic anemia in man. *Drug Chem. Toxicol.*, 20: 239-253.
- Son C. P. N., 2002. Chloramphenicol analysis in shrimp. CASE study of GC and HPLC-MS validation at the centre of analytical services and experimentation (CASE) of Ho Chi Minh City. Viet Nam: CASE(<http://www.hcmuaf.edu.vn/CdHoiThao/ELISA-7>).
- Wang W., H. Lin, C. Xue, J. Khalid, 2004. Elimination of chloramphenicol, sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated-feed treatment. *Environ. Inter.*, 30: 367– 373.