

检测屠宰动物四环素药物残留的 ELISA 方法应用研究(译文)

市售四环素类抗菌素中,四环素、金霉素、土霉素和罗利霉素在德国仍允许兽医使用。尽管 1976 年以后四环素在饲料添加剂中的使用以处方权的方式得到了限制,但仍与青、链霉素一起广泛地应用于细菌感染的治疗。作为商品,四环素仍是世界上最广泛使用的抗生素。由于可能仍有使用不当或没有合理的停药期。因此肉食品中四环素的残留仍是一个问题。

为保护消费者,欧共体在 1992 年 1 月 1 日实施了 No.2377/90 法律,该法律规定了欧共体成员国中所有动物源性食品中允许的药物最高残留量(MRL)。对残留量有规定的抗生素包括了青霉素、链霉素、四环素、氨基糖苷类抗生素、喹诺酮、甲砒霉素、大环内酯类抗生素和磺胺药等。具体对四环素类抗生素的 MRL 的规定为:在肝脏中必须在 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下,在肌肉中必须在 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。

与物化方法比较,酶联免疫测定法具有敏感性高,设备要求较低和相对快速、简单等特点。Lang 等(1992)建立了检测牛奶中四环素、金霉素和罗利霉素含量的 ELISA 方法,其检测灵敏度约为 3 $\mu\text{g}/\text{L}$,检出率为 100%。

本试验的目的是欲搞清从肉类食品卫生检验的角度,将 ELISA 法运用到尿液、血清和组织液的检验中去,在确定畜禽组织中是否含有四环素残留的同时,是否可直接检测尿液和血清中的四环素含量。

1 材料与方 法

四环素和酶联抗兔 IgG 购自 Sigma 公司。稀释用缓冲液为含 0.15 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L pH 7.3 PBS。标准阳性对照,用 PBS 对四环素进行稀释,其稀释后的浓度为 20 000 pg/mL 、6 666 pg/mL 、2 222 pg/mL 、741 pg/mL 、247 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 82 pg/mL 。

阴性试样 60 份“阴性”尿样采自 19 个农场的牛或奶牛,它们在 6 个月内未使用过抗菌素。

阳性试样 尿样来自一头经子宫给药总量 1 g 的四环素奶牛,第一天和第九天采集。

现场采样 64 份试样采自屠宰场,其中 20 份来自小牛,8 份来自 3 岁以下肉牛,22 份来自奶牛,14 份来自猪。每只家畜均采尿样、血清、肌肉和肾脏试样。

试样制备 为减少非特异性反应,尿液和组织液试样均用含 2% 酪蛋白的 PBS 稀释,最终浓度为

1/20, pH 7.0~7.5。组织液为经玻璃珠处理并离心所得上清。

抑菌试验 按 VwVfihc(1989)方法稍加改进后进行,该法检测金霉素的灵敏度为 0.25 mg/L ,盐酸四环素为 0.1 mg/L ,土霉素为 0.25 mg/L (Unglaub 等,1984)。

酶免疫测定 该法的操作和结果分析按 Lang 等(1992)方法进行。所采试样分别在奥伦多夫和慕尼黑进行平行测定。

2 结果

标准四环素稀释试样的 ELISA 测定结果显示出典型的曲线,在光密度和浓度之间存在很好相关性。尿样中可测出的平均极值大约为 5 ng/mL (经 1:20 稀释)。在尿样中加入 5、10、20 ng 四环素后,其检测的重现率(即测定值与原值之比)分别为 81.6%、101.6%、98.6%(见表 1)。标准差的最大值出现在检测 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,为 15.5%。

表 1 标准四环素稀释尿样
经 ELISA 检测结果的重现率和标准差 $\mu\text{g}/\text{kg}$

检测批次 (不同天数)	在阴性尿样中分别 加入四环素后的检测重现率 %		
	5	10	20
1	72	108	100
2	80	114	85
3	64	94	87
4	96	102	97
5	96	90	124
平均重现率	81.6	101.6	98.6
标准差 s	14	9.8	15.5
RSD %	17.2	9.6	15.7

采自 19 个农场的 60 只“阴性试样”的检测结果显示有些出乎意料。共有三个农场 18 只试样含有 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上的四环素,且 16 只试样来自同一农场。出现这一结果的可能原因是该农场的矿物添加剂中含有少量的四环素。其它两个农场各有一只动物出现阳性,测定浓度分别为 10 和 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$,年龄均为一岁

左右。

经子宫给药途径使用过 1 g 四环素的奶牛被作为阳性对照,其用药后 9 d 的测定浓度仍在 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上。

现场随机采样(表 2)检测结果显示,64 只家畜中有 44 只试样,其四环素浓度在 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下,13 只在 6~40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,7 只在 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上。

肉和肾脏。表 4 显示了同一阳性动物尿样、血清和组织液的四环素水平,该 3 种试样的检测结果比较一致。尿样阴性的动物,其血清和组织液检测结果也为阴性。

左右。

经子宫给药途径使用过 1 g 四环素的奶牛被作为阳性对照,其用药后 9 d 的测定浓度仍在 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上。

现场随机采样(表 2)检测结果显示,64 只家畜中有 44 只试样,其四环素浓度在 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下,13 只在 6~40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,7 只在 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上。

表 2 随机采样的
屠宰动物尿样中四环素的浓度 $\mu\text{g}/\text{kg}$

	≤ 5	6~20	21~40	> 40
22 头 奶牛	21	—	—	1
20 头 小牛	10	2	2	6
8 头成年肉牛	7	1	—	—
14 头 猪	6	6	2	—
总计 64 头	44	9	4	7

—: 未检出

表 3 检测尿样中
四环素浓度的 3 种方法结果比较 $\mu\text{g}/\text{kg}$

尿样编号	ELISA 奥伦多夫	ELISA 慕尼黑	抑菌圈 $\text{mm}^{(1)}$	HPLC
R32	22	27	—	未测
R34	33	20	3	< 30
R59	> 40	120	11	104
R72	> 40	116	8	75 ⁽²⁾
R8	> 40	148	12	< 30
R24	> 40	169	11	182
R25	> 40	25	10	未测
R26	> 40	88	8	61
R28	> 40	147	10	178
R52	21	7	—	< 30

(1) pH 值为 6.0,其他 pH 的抑菌圈均要小于 pH 6.0 的抑菌圈

(2) 四环素和金霉素的总量

表 3 显示了 ELISA、抑菌试验和高压液相色谱 (HPLC)3 种方法检测四环素的结果比较。经 ELISA 检测在 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上的试样,在抑菌试验中的抑菌圈均大于 8 mm;除 R8 外,HPLC 也得到类似结果。

本实验还应用 ELISA 分别对同一动物的尿样、血清和组织试样进行了检测,其组织试样分别来自肌

3 讨论

为了使检测尿样中四环素含量的过程更快捷简便,本试验简化了复杂的试样抽提程序。一开始采用 ELISA 测定不稀释尿样直接进行检测,结果均在 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 左右,其原因可能是在未稀释的尿样中含有 0.3 mg% 丙酮(该值为亚临床酮血症的极限)及较高浓度的尿素,干扰了 ELISA 的检测结果;而经 PBS 1:20 稀释后再测,假阳性的结果即未被再次测到。

表 4 以尿样、血清、肌肉和肾脏
组织液为检样时的四环素浓度检测结果 $\mu\text{g}/\text{kg}$

	尿样	血清	肌肉组织液	肾脏组织液
R8 奶牛	> 40	4.0	8.2	20.0
R24 小牛	> 40	8.8	7.2	38.8
R25 小牛	> 40	7.1	9.6	33.2
R26 小牛	> 40	9.4	9.7	29.2
R28 小牛	> 40	10.6	9.4	44.2
R52 小牛	21	< 5.0	< 5.0	7.1
R32 猪	22	< 5.0	未采样	未采样
R34 猪	33	< 5.0	< 5.0	10.2
R59 小牛	> 40	8.2	< 5.0	> 40.0
R60 小牛	37	5.6	11.2	> 40.0

然而,本试验中有 2 只确认阴性动物的检测结果为阳性(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$)很难解释,尽管他们只占了试样中很小的部分(44 只家畜中的 2 只)。其可能原因:(1)由于动物饲养我们不能完全掌握,可能有四环素的污染。(2)出现的 2 只阳性试样均为年青牛,估计尿中的四环素是由于参与骨代谢之故。因家畜在饲养过程中,四环素可以沉积在骨骼里,尤其当矿物质的转化率得到加强的时候,比如产奶或腹泻引起矿物质缺乏时,四环素可以重新进入代谢过程,并少量分泌出来。给予牛含金霉素 80 mg/kg 饲料,在体重从 60 kg 增加到 110 kg 这段时间里,骨中的金霉素含量约为 35.5mg,80%~90% 的小牛的骨骼中含有 2~125 mg 即可得到证实。然而,金霉素在成年牛中未被测出,因此对成年牛(屠宰牛)没有理由因四环

素在骨中沉积而确定为阳性结果。

这些推测从屠宰家畜的尿样检测得到证实。在成年牛中只有 1/22 只老牛(奶牛)和 1/7 只肉用屠宰牛为四环素的阳性结果,而小牛和猪的尿样检测结果则有半数阳性,而且很多小牛尿样的四环素浓度超过了 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

有一个试样,在 ELISA 检测中为 149 $\mu\text{g}/\text{kg}$,而 HPLC 结果阴性,但抑菌试验则得到明显的直径为 12 mm 的抑菌圈。估计是由于 HPLC 测定范围只包括了四环素、土霉素和金霉素,而试样中则可能还有其它四环素的衍生物。

从检测尿样、血清和组织液的结果比较来看,在应用中,检测组织液中的四环素含量似乎没有必要,因为尿样和血清的测试系统灵敏度已完全能满足检测的需要。特别是根据对肌肉中四环素 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 这一检测界限,该法不会产生假阴性的结果。

总之,本研究证实了 ELISA 是检测食用动物组织和体液中四环素残留的适用方法。与抑菌试验相比,其优点在于它的灵敏度高;而与物化反应相比(如 HPLC),则在于它更为简便且消耗少得多的有机物。此外,ELISA 适用大批量试样的检测,对于测定动物性食品中的抗生素残留,是一种非常有效和经济的方法,因此本法可作为检测四环素在肉食中残留的常规方法。目前该技术的发展,ELISA 不仅可以用于磺胺类药物的检测,而且随着复合 ELISA 发展,当应用于尿样中多种抗生素残留时,能很快给予“是”或“不是”的结果,是完全可行的;而检测组织肌肉试样药物残留是否可行,值得进一步探讨。

(徐 辉 浙江省农科院病毒室 (310021),译自 Ungiaub W, et al. Fleischwirtschaft International, 1997,(2)38~40。盛祖恬校。)

[上接第 30 页]

esophageal cancer in China. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 1626~1629.

14 Chu F S, Li G Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and mycotoxins in moldy corn from the People's Republic of China in regions with high incidence of oesophageal cancer. Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60: 847~852.

15 Michael f, Dutton Fumonisin. Mycotoxins of increasing importance: Their nature and their effects. Pharmacol Ther, 1996, 70: 137~161.

16 Park D L, Rua S M, Mirocha C J, et al. Mutagenic potential of fumonisin contaminated corn following ammonia decontamination procedure. Mycopathologia, 1992, 117: 105~108

17 Cawood M F, Gelderblom W C A, Vleggaar R. Isolation of the fumonisin mycotoxins; a quantitative approach. J Agric Food Chem, 1991, 39: 1958~1962.

18 Rottinghaus G E, Coatney C F, Minor H C, et al. A rapid sensitive thin layer chromatography procedure for the

detection of fumonisin B₁ and B₂. J Vet Diagn Invest, 1992, 4: 326~329.

19 Sydenham E W, Shephard G S, Thiel P G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds. J Assoc Off Anal Chem Int, 1992, 75: 313~318.

20 Shephard G S, Thiel P G, Sydenham E W. Determination of fumonisin B₁ in plasma and urine by high performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1992, 574: 299~304

21 Azcona - Llivera J I, Aborzied M M, Plattner R D. Generation of antibodies reactive with fumonisins B₁, B₂ and B₃ using cholera toxin as the carrier adjuvant. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 169~173

22 Azcona Llivera J I, Aborzied M M, Plattner R D. Production of monoclonal antibodies to the fumonisins B₁, B₂ and B₃. J Agric Food Chem, 1992, 40: 531~534