

ELISA 法检测动物血液、尿液及脏器中药物残留量

丁 丹¹ 方友平² 王有祥² 杨勇敏² 徐丹华¹

1.湖北省十堰市动物产品质量监督检验测试中心,湖北十堰 442000;

2.湖北省十堰市动物卫生监督所,湖北十堰 442000

摘要 为了探寻较为方便、有效的药物残留测定方法,十堰市动物卫生监督所和十堰市动物产品质量监督检验测试中心进行了利用动物血液来检测克伦特罗含量的技术尝试,分别采集动物血液、脏器和尿液进行克伦特罗含量检测,发现不同部位样品的克伦特罗含量有差异性、相关性和规律性。

关键词 ELISA 法;血液;尿液;肝脏;药物残留

酶联免疫法(ELISA)基本原理是:把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应,结合在固相载体上的酶量与标本中受体物质的量有一定的比例,加入酶反应的底物后,底物被酶催化水解或发生氧化还原反应而成为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。ELISA 法具有灵敏性高等特点,广泛应用于动物体内药物残留测定。然而,人们往往将动物尿液和脏器作为样品进行检测,但脏器只能屠宰后才可进行检测,尿液采集也因条件限制费工费时。能否利用动物血液来检测克伦特罗(俗称“瘦肉精”)含量,十堰市动物卫生监督所和十堰市动物产品质量监督检验测试中心对此进行了技术尝试。

1 材料与方 法

1.1 试验仪器及试剂

Sunrise 酶标仪(滤光片波长为 450 nm/630 nm)、离心机(3 000 ~ 4 000 r/min)、微量移液器(10 ~ 300 μ L,单道、多道)。酶联免疫试剂盒 III、IV 型(由北京维德维康生物技术公司生产):克伦特罗酶标板、标准品工作液(浓度分别为 0.0、0.1、0.3、0.9、

2.7、8.1 μ g/L)、高浓度(100 μ g/L)标准品、克伦特罗酶标记物浓缩液及稀释液、洗涤液、底物 A 液及 B 液、终止液、组织提取液等。

1.2 试验动物

随机挑选 8 头健康的育肥猪,平均体重 60 kg 左右,按常规饲养,自由饮水,饲喂配合日粮(不含抗菌药物),于饲料中添加 5 mg/kg 盐酸克伦特罗,连续饲喂 20 d。

1.3 样品测定

分别于饲喂期第 0(6 h)、1、2、3、5、7、10、14、20 天采集猪的尿液和血液检测克伦特罗含量,再于停药期第 0(6 h)、1、2、4、8、10、14、20 天采集对应猪的尿液和血液进行检测。停药当天,采集血液和尿液后,随机选择 4 头猪屠宰,采其肝脏,对应编号,测定克伦特罗的含量;停药第 20 天,屠宰剩余 4 头猪,测定肝脏中克伦特罗的含量。

1)样品的制备。尿样和血样:将饲喂期及停药期第 0(6 h)、1、2 天采集的尿液离心、取上清液稀释 100 倍待用,血液稀释 10 倍待用;再将停药期第 4、8、10、14、20 天采集的尿液离心、稀释 10 倍待用,血液不稀释。肝脏样品:取 2 g 均质后的样品,加入 6 mL 稀释好的组织提取液,充分涡动 2 min,4 200 r/min 以上离心 10 min,取上清液待检。

收稿日期:2014-01-20

通讯作者:杨勇敏

丁 丹,女,1977 年生,硕士,兽医师。

2)溶液的配制。用酶标记物稀释液按 1:10 配制酶标记物工作液,待用;用去离子水按 1:20 配制洗涤工作液,取上清液进行检测。

3)检测步骤。每孔分别加入标准品、待测样品(标准品和样品做两孔平行试验)各 20 μL;然后加入已稀释的克伦特罗酶标记物 50 μL,盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板,充分混合后,室温(25 ℃)下避光反应 30 min;洗板后,每孔加入 100 μL 底物(A、B 溶液按体积比 1:1 混合),室温下避光反应 10~15 min,每孔加入 50 μL 终止液,于酶标仪 450 nm 波长(参考波长 630 nm)处测定结果。

1.4 添加回收试验

添加浓度为 2 μg/L 的克伦特罗标准工作液,8 个平行,方法同样品检测方法。

1.5 数据分析

各标准品或样品的平均吸光度值,除以零标(浓度为 0 μg/L 标准品)的吸光度值,乘以 100%,即可得到各标准品对应吸光度的百分比。以吸光度的百分比为纵坐标、标准品浓度的自然对数为横坐标构建标准曲线。将待检样品的吸光度的百分比代入标准曲线,得出样品对应的浓度,再乘以样品的稀释倍数,即为样品实际残留量。

用 RIDAWIN 数据分析软件对数据进行分析,得出试料中克伦特罗的含量。

2 结果与分析

1)饲喂克伦特罗 6 h 后,猪尿液和血液中即出现高含量的克伦特罗,8 头猪尿液中的克伦特罗残留量达到 242.0~916.0 μg/L,血液中的残留量达

到 6.2~13.8 μg/L,详见表 1。

喂药期间,猪尿液和血液中的克伦特罗残留量总体呈上升趋势,并呈一定的正相关性, $y = 86.17x - 326.06, r = 0.968$ 4,在饲喂第 10 天达到高峰,详见表 2。

2)停药后 0~2 d,猪尿液和血液中克伦特罗残留量迅速下降,分别由停药当天的 502.50、14.40 μg/L 下降到停药 2 d 后的 73.30、5.43 μg/L,随后下降缓慢;停药后第 14 天克伦特罗残留量仍高于中国农业部规定的猪尿中最高检测残留量 1 μg/L 的标准,详见表 3。

在整个休药期间,尿液中克伦特罗含量和血液中克伦特罗含量也呈正相关性, $y = 38.869x + 146.73, r = 0.958$ 7。停药当天肝组织中克伦特罗含量高达 1 823.30 μg/L,说明克伦特罗容易在肝组织中累积;停药第 20 天屠宰,肝组织中克伦特罗平均残留量为 6.83 μg/L,仍然超标,易引发中毒事件。

3)每次检测均设置添加回收试验,回收率范围在 78.9%~94.2%。被检样品送省内大专院校运用 GC-MS 法进行验证,与实验室检测结果相符。

3 讨论

通过试验表明,随着饲喂时间的延长,克伦特罗在猪体内的含量逐步上升并在猪体内累积,存在相对稳定的趋势。在停药后第 20 天检测血液,仍能检测到克伦特罗残留量,而人们往往忽视了血液中克伦特罗残留的监控。本试验表明,运用 ELISA 技术检测血液中克伦特罗含量,从而监控生猪是否违

表 1 饲喂 6 h 后血液和尿液中克伦特罗残留量

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	平均
血液	11.0	13.8	6.2	12.6	7.5	9.5	8.3	10.6	9.9
尿液	635.0	916.0	242.0	741.0	302.0	471.0	419.0	516.0	530.3

表 2 饲喂期血液和尿液中克伦特罗平均残留量

测定时间	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天	第 20 天
血液	9.9	10.3	18.6	12.8	15.4	18.3	21.6	19.5	21.9
尿液	530.3	565.7	921.1	613.6	769.9	833.3	1 019.8	836.5	995.4

表 3 休药期各组织克伦特罗残留含量

测定时间	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 4 天	第 8 天	第 10 天	第 14 天	第 20 天
血液	14.40	9.56	5.43	4.33	2.56	1.87	1.25	0.93
尿液	502.50	215.30	73.30	59.50	40.30	29.90	14.40	4.43
肝脏	1 823.30	/	/	/	/	/	/	6.83

禁添加克伦特罗是可行的。对于兽医部门来说,血液是最容易获得、也是覆盖面最全的样品,因此可通过检测血液中克伦特罗含量,达到动物活动筛选的目的,从而从源头上控制动物产品安全。

ELISA 法是检测克伦特罗较高效的免疫分析法,也是国家标准中动物性食品中克伦特罗的筛选方法。从本次试验可以看出,用 ELISA 试剂盒检测克伦特罗,具有较高的灵敏度和特异性,适用于大批量血液样品中克伦特罗的定性定量检测,能较

好地满足基层实验室对生猪克伦特罗含量的检测。

目前我国规定组织中的最高残留限量为不得检出,但 ELISA 方法为快速筛选方法,存在假阳性情况,因此农业部规定的阳性判定限为 1 μg/L。从本次试验结果可知,停药后第 20 天尿液和肝组织中克伦特罗含量超标,而血液中克伦特罗含量为 0.93 μg/L,略低于判定标准。因此,以血液作为检测对象时,检测阳性判定限越低越好,可参考欧盟组织的规定(0.5 μg/L)。

家禽免疫方法多 春季饮水最简便

春季是疫病的高发期,适时进行免疫是有效控制疫病发生的重要手段。家禽免疫方法很多,但其最简便的方法就是饮水免疫法。

饮水免疫以其方便、省事、省力、应激小等优点,已被大多数养殖户接受。但很多养殖户对饮水免疫的操作规程和具体实施细节还认识不透彻,不能够充分发挥饮水免疫的作用,从而造成免疫失败。所以要想使饮水免疫收到最理想的效果,必须注意以下 9 点。

1)使用高效弱毒疫苗。饮水前必须注意疫苗的质量、有效期。不可使用劣质、过期疫苗及贮存不当的疫苗。

2)饮水免疫前,将供水系统、饮水器具彻底清洗干净,但不能用消毒剂和洗涤剂处理。饮水器具不能用金属制品,最好用瓷器和塑制器具。

3)饮水免疫用水应是蒸馏水、冷开水或清洁的深井水。水中不应含有重金属离子和卤族元素。自来水应煮沸后放置过夜再使用。对大型养鸡场,可在自来水中加入去氧剂,每 10 L 水中加入 10%的硫代硫酸钠 3~10 mL,具体用量还要看水中的氯含量而定。

4)疫苗应开瓶倒入水中,用洁净木棍搅拌均匀。如果室外风大,应在室内进行稀释。最好在稀释液中加入 0.2%~0.5%的脱脂奶粉或山梨糖醇,以保护疫苗效价。

5)饮水免疫前应停水 3~6 h,停水时间长短应视室温高低和饲料干湿程度灵活掌握。室温高且喂干粉料时,停水时间短些;室温低时,停水时间长些。

6)饮水前必须按照鸡群数量多少、鸡龄大小确定饮水器的数量,使 90%以上的鸡能同时饮到足够的疫苗水。鸡群大、饮水器不足时可分批进行,防止疫苗失效。

7)稀释疫苗的水量要适宜,不可过多或过少,应参照疫苗使用说明、免疫鸡日龄大小和数量以及当时的室温来确定。疫苗水应 1~2 h 内饮完,但为了让每只鸡都能饮到足够量的疫苗,饮水时间又不应少于 1 h。可在用疫苗前 3 d 连续记录鸡的饮水量,取其平均值以确定饮水量。

8)炎热季节,饮水免疫宜在清晨进行,应避开高温时间。疫苗稀释液不得暴露在阳光下。

9)饮水免疫前后 2 d(合计 5 d,最好是 7~10 d)内饮水、饲料中不得加入能灭杀疫苗中病毒(或细菌)的药物及消毒剂。

来源:农村报