

TTC 和 ELISA 法检测纯牛奶中抗菌药物残留比较

何金环, 王一凡 (郑州牧业工程高等专科学校生物工程系, 河南郑州 450011)

摘要 采用TTC法、ELISA检测法对随机抽取的50份纯牛奶样品进行抗生素残留分析。TTC法测出抗菌药物阳性率为16%;ELISA法测出抗菌药物阳性率为20%,其中四环素残留阳性率为5%,链霉素残留阳性率为15%,青霉素残留阳性率为8%,磺胺二甲 检测全部为阴性,二者结果基本一致。结果显示,部分牛奶中有抗菌药物残留。

关键词 抗菌药物;牛奶;TTC;残留

中图分类号 TS252.7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02576-02

Determination of Antibiotics Residues in Pure Milk with TTC and ELISA Test

HE Jin huan et al (Department of Bioengineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry and Engineering, Zhengzhou, Henan 450011)

Abstract 50 samples were selected in order to know the situation of antibiotic residue with milk and detected the antibiotic residue by TTC and ELISA test. Both showed the similar results. The positive rate of antibiotics was 16% with TTC test; The positive rate of antibiotics residue was 20% with ELISA test, of which the residue of tetracycline was 5%, the residue of streptomycin was 15%, the residue of penicillin was 8%. But there was no sulphadiazine residue in samples. The results showed that the residue of antibiotics was fact in part milk at Zhengzhou market.

Key words Antibiotics; Pure milk; TTC; Residue

目前我国生产管理上常用的抗菌药物残留快速检测方法主要有氯化三苯四氮唑(TTC)法和酶联免疫吸附剂测定(ELISA)法。TTC法是一种微生物学方法,其原理是嗜热链球菌(*S. thermophilus*)在牛乳中生长时会将无色的2,3,5-氯化三苯基四氮唑还原为红色的三苯甲瓞;而当牛奶中存在抗生素等抗菌物质时,会抑制嗜热链球菌的生长,TTC则无法被还原。ELISA测定法是根据酶标记的抗体或抗抗体来进行的抗原-抗体反应。该法的优点是:可以通过显色来快速进行定性分析,特异性强,灵敏度高,酶标板上1次可以作多份样品检测。笔者随机抽取50份牛奶样品采用上述2种方法测定,对结果进行比较分析。

1 材料与方 法

1.1 材料 纯牛奶样品:郑州市各大超市售(随机取不同品牌、不同包装、2个生产日期的消毒纯牛奶);不含抗生素的健康鲜牛奶,由花花牛乳业集团提供。菌种:嗜热链球菌,河南省花花牛乳业集团提供。药品:青霉素G钾标准品;TTC;各抗生素类残留检测试剂盒(英国Randox公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理。将无抗健康鲜牛乳以2000 r/min的转速离心15 min,去除上层脂肪,113℃灭菌15 min,待用。

1.2.2 TTC法检测。

(1)将嗜热链球菌冻干粉接种于脱脂牛乳中,36℃培养18 h后,菌液接种至灭菌脱脂乳,再经36℃培养15 h。

(2)用灭菌脱脂乳以1:10、1:20、1:40、1:80的比例稀释菌液,待用。

(3)阴性对照管为无抗生素10%还原脱脂乳溶液,阳性对照管为10%还原脱脂乳加青霉素钾盐。

(4)确定被测奶样中需要加入嗜热链球菌的量。取10 mm×150 mm试管,每管加入无抗奶9 ml,80℃水浴加热5 min后,冷却到37℃以下。加入1 ml上述用灭菌脱脂乳稀释好

的菌液,在36℃水浴中培养2 h。然后加入4%TTC溶液0.3 ml,继续水浴培养30 min后观察结果。以显色为微红色的试管相对应的菌液稀释度作为以下实验用稀释度。

(5)抗生素检测。在试管中加入9 ml含抗生素的牛奶,对照管牛奶不含抗生素,80℃水浴5 min,随后冷却到37℃以下。各加入1 ml菌液(稀释度由上述实验确定),36℃水浴2 h。然后加入4%TTC溶液0.3 ml,继续水浴,每隔15 min观察一次结果。若待测牛奶的颜色比对照乳液颜色浅,则判定为阳性(表1)。每种药物阳性结果中对应的最低含量,即为该药物的最低检出量。每种药物重复测定3次。

表1 显色状态判断标准

显色状态	判断	显色状态	判断
未显色者	可疑	桃红色~红色	阴性
微红色者	可疑		

1.2.3 ELISA法检测。根据ELISA试剂盒操作说明书进行。建议将所有需要用的试剂在测试前都带到室温测试间,为减少交叉影响,建议将酶标板用粘性密封纸封住。每个测试做2套。建议用图1顺序排列酶标板(每格代表2孔)。

S1	T1	T9	T17	T25	T33
S2	T2	T10	T18	T26	T34
S3	T3	T11	T19	T27	T35
S4	T4	T12	T20	T28	T36
S5	T5	T13	T21	T29	T37
S6	T6	T14	T22	T30	T38
QC	T7	T15	T23	T31	T39
QC	T8	T16	T24	T32	T40

注:S为标准;QC为质量控制;T为测试样品。

图1 酶标板排列顺序

2 结果与分析

此次检测牛奶50份,抗菌药物残留阳性显示10份,阳性率为20%,牛奶中各抗菌药物残留限量及各检测方法的最低检测限见表2。

本地与外地纯牛奶中抗菌药物残留比较见表3。

各抗菌药物在阳性样品中所占比例见图2。链霉素残留比例最高,达45%;青霉素残留和四环素残留比例分别为29%和26%;磺胺二甲 未检出。

基金项目 河南省教育厅自然科学研究项目(2006230010)。

作者简介 何金环(1974-),女,河南驻马店人,硕士,讲师,从事生物检测、生理生化教学和研究工作。

收稿日期 2006-12-11

表2 消毒纯牛奶中抗菌药物残留的检测概况

检测方法	检测药物	阳性率	检测限	最高允许残留
		%	ng/ml	ng/ml
TTC	抗生素	16.0	0.004 1	-
ELISA	磺胺二甲	0	15	100
	四环素	5.0	15	100
	链霉素	15.0	20	200
	青霉素	8.0	6.0	4.0

注: 抗生素检测限单位为 U。

表3 本地与外地纯牛奶中抗菌药物残留比较

地区	份数	阳性数	阳性率 %
本地	15	1	6.67
外地	35	9	22.86

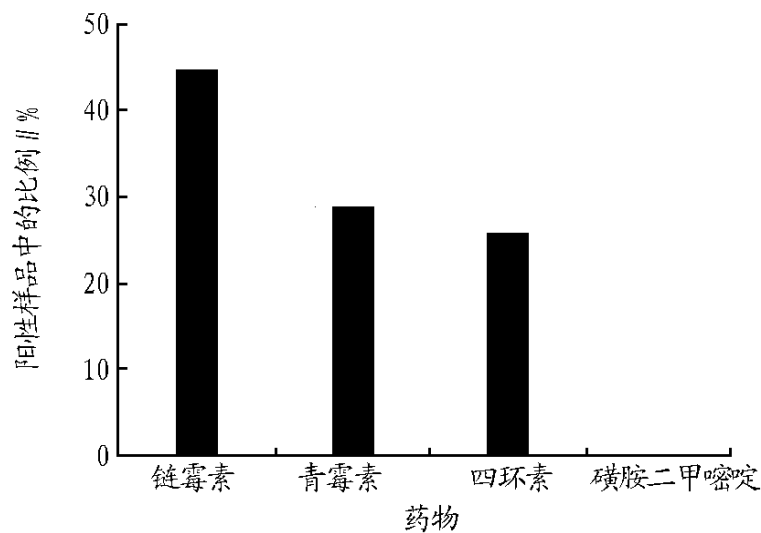


图2 各抗菌药物在阳性样品中的比例

3 讨论

从检测总体情况来看, 抗菌药物残留不容乐观。个别药物残留相当高, 有2份样品均检出2种以上抗生素残留。不同包装纯奶中鲜奶残留率较低, 而巴氏消毒袋奶和瓶装奶残留率较高。一般临床治疗乳房炎往往采用青霉素、链霉素联合用药方法, 此次检测中链霉素残留明显高于青霉素, 并不说明青霉素用药少于链霉素, 这可能与青霉素水溶液不稳定, 遇酸、遇热时部分青霉素被分解破坏有关。

比较结果表明, 对于牛奶中残留的青霉素、磺胺等进行检测, TTC法的灵敏度可以达到农业部的检测要求; 对链霉素的检测, TTC法的灵敏度还不够。传统TTC法中被检牛奶加入嗜热链球菌菌液时, 只是说将培养15 h的细菌原液1:1稀释后使用。事实上, 由于受菌种活力、培养用脱脂乳营养成分等多种因素的影响, 此时的菌液量已难以统一。加入的细菌数量过多或过少均会对实验结果产生影响。因此, 笔者在检测时, 增设了一个确定菌液稀释度的步骤, 收到很好的效果, 实验结果重现性好, 灵敏度符合要求。按照国家标准描述, 在被检牛奶中加入TTC试剂培养30 min后观察结果, 若实验管呈现白色, 则继续培养0.5 h。笔者在实验时发现, 当牛奶中抗生素含量比较低时, 可以在加入TTC试剂培养10~15 min后观察牛奶的颜色变化。因为有时加入TTC后培养时间过长, 低含量的含抗菌药物奶颜色会和无抗菌药物奶颜色趋于一致, 无法分辨出两者间的差别。

就检测对象而言, TTC法不受所检测的抗生素种类所限, 各种影响细菌生长的抗生素均可检出。但亦有可能出现假阳性, 有报道指出, 足够浓度的洗涤剂物质的残留可影响细菌生长而使实验结果为阳性。在反复使用的牛奶容器中可能出现这一情况。ELISA法的优点是特异性高、快速、准确。但是因为我国目前的ELISA试剂主要针对β-内酰胺类抗生素, 对其他抗生素如庆大霉素、磺胺类药物、土霉素等常用药物不敏感, 因此在实际检测过程中难免会造成疏漏。和ELISA法比较, TTC法的成本低廉, 但检测花费的时间较长, 需要3~4 h才能完成对1个样品的检测。因此, 在实际使用时, 可以根据具体情况, 选择合适的检测方法。

参考文献

- [1] 靳敏, 夏玉宇. 食品检验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 320-339.
- [2] 白建, 黄素珍. 纯牛奶中抗菌药物残留的检测[J]. 乳业科学与技术, 2006(1): 15-17.
- [3] 邓冬云, 余淑冰, 梁景涛, 等. 牛奶中抗生素残留两种测定方法的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(5): 661-662.