

动物源性食品安全快速检测及酶联免疫吸附方法的应用

■ 周宏琛 闫秋成 田晓林 朱涛 (济宁出入境检验检疫局技术中心 济宁 272025)

摘 要: 本文介绍了动物源性食品安全的定义和存在的主要问题, 重点阐述了酶联免疫吸附方法 (ELISA) 在兽药残留、农药残留、动物疫病、微生物、动物毒素快速检测中的应用。

关键词: 动物源性食品安全; 快速检测; 酶联免疫吸附方法 (ELISA)

Rapid Determination of Animal Food Safety and the Application of ELISA

Zhou Hong-chen, Yan Qiu-cheng, Tian Xiao-lin, Zhu Tao

Abstract: In this paper, the definition and questions of animal food safety were introduced. The application of ELISA in rapid determination was commented, including the determination of food drug residue, pesticide residue, epidemic disease, microorganism and animal toxin.

Keyword: animal food safety; rapid determination; ELISA

由于环境污染问题、新技术的应用和新材料的开发以及农业生产方式的改变, 食品污染问题日趋多样化和复杂化, 食品安全不断面临新的挑战。食品安全已经不是一般的质量问题, 各国政府和许多国际性组织都给与了高度重视, 食品安全控制正越来越注重从农场到餐桌的整个过程。特别是动物源性食品, 由于生长链长, 通过食物链的生物富集或外源性污染使有毒有害物质残留, 而引起人类的食源性中毒。发达国家对动物源性食品在安全、卫生、健康、环保方面的要求日趋严格, 并利用其在检测技术上的优势, 不断增加检测项目, 提高食品质量标准。中国加入 WTO 后, 食品安全领域技术性贸易措施已成为动物源性食品进入发达国家市场的首要非关税壁垒。

动物源性食品安全检测的发展方向是快速、灵敏。许多检测方法由于具有很大的局限性, 无法满足国外严格的限量要求和企业大批量样品快速检测的需要。传统生物方法检测操作繁琐, 不适用于企业建立快速有效的产品追溯体系; 气相色谱、液相色谱等化学方法需要昂贵的大型仪器设备, 检

测成本高, 在中小型企业难以推广。酶联免疫吸附方法 (ELISA) 具有灵敏度高、特异性强、操作简便、处理样品量大、不需要昂贵的仪器设备特点, 作为动物源性食品安全的快速检测方法非常实用。本文通过对 ELISA 方法应用的介绍, 旨在促进该技术在企业自检体系中的推广和应用。

1 动物源性食品安全

1.1 动物源性食品安全的定义

1996 年, 世界卫生组织 (WHO) 在其发表的《加强国家级食品安全性计划指南》中将食品安全解释为“对食品按其原定用途进行生产和 / 或食用时不会对消费者造成损害的一种担保”。绝对的食品安全是难以达到的, 一般提到的食品安全是指相对的食品安全, 即一种食物或成分合理食用方式和正常食用量下不会导致对健康损害的实际确定性。在评价一种食品是否安全时, 应通过一定的检测手段提供科学的依据, 确定食品中的有害物质和毒性, 通过风险评估来考虑是否造成对人体的实际危害^[1]。

动物源性食品安全是指畜禽肉、水产品、禽蛋、乳类等及其制品中不应含有可能损害或威胁人体健康的物质或因素。

1.2 动物源性食品安全存在的主要问题

1) 生物性污染 包括细菌、真菌及它们产生的微生物毒素、病毒、寄生虫及其虫卵、昆虫等,可引起食物中毒、消化道、呼吸道感染病以及其它人畜共患病等。

2) 化学性污染 包括农药、兽药、食品添加剂、“三废”环境污染、苯并芘、N-亚硝基化合物、动物毒素等,在人体内蓄积中毒,危害的程度根据污染种类和体内蓄积浓度而定。

3) 物理性污染 包括放射性污染、金属异物等外来杂质污染。

出口肉类、水产品等企业已经逐步实施 HACCP 体系,变最终产品检验为预防性质量保证方法,使食品污染减少到最低程度。该预防性管理系统对控制加工环节的致病性细菌污染和物理性污染是有效的,现在出口动物源性食品面临的突出问题是在加工环节难以控制的动物疫病、原料化学性污染问题。日前,日本厚生劳动省公布了 2005 年对世界各国进口食品实施强制性批批检验(检查命令)的品种,其中针对中国的品种为 30 个,是全部检验品种的 25.2%,包括蜂蜜、鸡肉、贝类、鳗鱼、虾、海胆等,被检项目主要是针对各种食品内的药残、农残、贝类毒素、添加剂及致病菌等。因此对动物源性食品中有毒有害污染物进行检测是保障食品安全的必要前提。

2 动物源性食品安全快速检测技术和酶联免疫吸附分析法的应用

2.1 酶联免疫吸附(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; 简称 ELISA) 是一种酶免疫方法,其特点是抗原或抗体的固相化和酶标记,90 年代末期 ELISA 技术不断发展以及全自动酶标分析仪的应用,使其特异性与灵敏度有很大提高,在食品检测领域中的应用大大扩展。ELISA 已经成为一种系列化、微量化、商品化的食品安全快速检测方法,是目前应用最广泛的生物检测技术之一。

2.2 ELISA 方法在兽药残留检测的应用

2.2.1 兽药残留快速检测技术

包括:1) 传统的微生物抑制试验,容易受组

织中其它抗生素的影响,特异性低、灵敏度低。2) 放射免疫测定法,使用有害的放射性同位素,需要特殊的辐射防护设备。3) ELISA 方法。

2.2.2 ELISA 方法在兽药残留检测的应用现状

目前,ELISA 试剂盒在兽药残留检测中已得到广泛使用。国外商品化的试剂盒可进行氯霉素、盐酸克伦特罗、激动剂、链霉素、庆大霉素、新霉素、依维菌素、磺胺二甲嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺喹恶啉、恩诺沙星、四环素族、己烯雌酚、安定、皮质类固醇、去甲基雄三烯醇酮等项目的检测。国内相关的应用研究有:单国强等建立了间接竞争 ELISA 法检测己烯雌酚残留,线性范围为 0.1~25.0 ng/ml,检测限为 10pg/扎,对天然雌激素几乎没有交叉反应。叶雪珠等使用进口试剂盒对鱼、虾、河蟹、甲鱼 4 种水产品中氯霉素含量进行检测,在 0.05~2.0ug/kg 范围内,线性关系很好,平均回收率为 76.2%,检测低限为 0.05ug/kg。关嵘等建立了我国自主知识产权的磺胺嘧啶残留的 ELISA 方法和试剂盒,灵敏度为 0.3ng/ml,定量直线范围为 0.1~8.1ng/ml,回收率约 60% 以上,与 HPLC 结果有一定的趋同性。张子群等使用进口 ELISA 试剂盒对牛奶、蜂产品、肉类样品四环素类抗生素进行检测,平均回收率为:96.6%,方法检测下限满足欧盟 675/92 号令中的要求。李青采用 ELISA 方法测定畜禽产品的青霉素残留,方法具有较高的敏感性。郑晶等将进口 ELISA 试剂盒应用于鳗鱼恩诺沙星残留检测分析,回收率平均为 72.5%,样品的检测低限可达到 3ug/kg。杨艳艳等利用国产 ELISA 试剂盒和 GC/MS 对照检测盐酸克伦特罗育肥猪的尿液样品,结果一致性很高 ($p>0.05$)^[2~8]。

2.3 ELISA 方法在农药残留检测的应用

2.3.1 农药残留快速检测技术

包括:1) 活体检测法,使用发光细菌或敏感性家蝇作为测定材料。2) 胆碱酯酶抑制法,是国内广泛使用的农药残留快速检测方法,但灵敏度低,无法满足出口食品检测的限量要求。3) 生物传感器法,不能进行多样品的同时分析,使其应用范围受到极大限制。4) ELISA 方法,美国环境保护署、美国农业部食品安全检验司和 AOAC 已经分别制定了有关农药残留的免疫检测试剂盒的评定和认可准则,明确了测定结果的法律效力^[9]。

2.3.2 ELISA 方法在农药残留检测的应用现状

国外已经研制出包括杀虫剂、杀菌剂、除草剂、生长调节剂等几十种农药的 ELISA 方法检测试剂盒。据报道,美国使用的 ELISA 试剂盒对有机磷农药普遍的最小检出浓度达 0.02mg/kg,对氨基甲酸酯类农药普遍的最小检出浓度达 0.3mg/kg。国外有关文献报道了奶、肉、肝、蜂蜜等动物源性样品中的西维因、呋喃丹、菊酯(总量)、灭多威、百草枯、伏虫脲、2,4-D、西玛津、阿特拉津、多菌灵、克百威、涕灭威等残留的检测^[9]。国内有关应用研究主要是水、土壤、蔬菜、饲料等环境样品和植物性样品的检测,直接用于动物源性食品的应用研究非常少。我国农药使用管理滞后,国家已经禁止使用的毒性大、降解慢、危害重的农药某些地区还在使用,通过食物链和环境接触在动物体内残留。《中华人民共和国 2005 年度出口动物及动物源性食品、进口动物源性食品残留物质监控计划》要求对动物产品中有有机磷类、有机氯类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类共计 14 个项目进行监控检测。因此,研究开发用于我国动物源性食品中农药残留检测的 ELISA 方法,具有广阔的发展前景和市场空间。

2.4 ELISA 方法在动物疫病检疫检测中的应用

2.4.1 动物疫病快速检测技术

包括:病原学诊断技术和免疫学诊断技术。免疫学诊断中的血清学试验方法简易而且快速,广泛用于免疫抗体水平的监测,为动物疫病的早期诊断和防治提供依据。主要有:1)中和试验方法;2)血细胞凝集抑制试验方法(HI);3)琼脂扩散试验方法(AGP);(4)ELISA 方法,国内外学者普遍证实该方法敏感性大于 AGP 和 HI 试验。

2.4.2 ELISA 方法在动物疫病检测的应用现状

国外商品化的试剂盒可进行禽类、猪、羊、牛、兔、鱼等各类动物疫病抗体的检测,部分试剂盒产品可以进行动物非感染、接种疫苗和自然感染的鉴别。国内相关的应用研究涉及病毒抗体检测和病毒抗原检测方法:母艳萍采用 ELISA 方法对甘肃省省内 4 个养殖场的 593 份猪血清进行了猪瘟(CSF)抗体的检测,CSF 强毒感染率为 0.3%,CSF 免疫抗体水平普遍较低,阳转率为 40%~70%。潘文波等使用美国 UBI 公司 ELISA 试剂盒进行了猪的口蹄疫病毒(FMDV)感染抗体和免疫抗体的检测,研究者认为该方法更方便、快捷和敏感,非特

异性为 4%。黄金海等建立了检测鸡慢性呼吸道病血清抗体水平的间接 ELISA 方法,比血凝抑制试验(HI)敏感性高 4 倍以上。肖运才等建立了禽流感病毒(AIV)抗原的夹心 ELISA 方法,敏感性比血球凝集试验高出 16 倍以上,具有较高的敏感性特异性。王传彬等初步建立了检测禽流感病毒的单抗-生物素捕获 ELISA 方法,能检测 H5N3 标准株和所有 20 株国内 H5 亚型 AIV 分离株,能检出 0.25 个血凝单位的 H5 血凝素抗原。黄金海等建立了禽霍乱血清抗体水平检测的 ELISA 方法,与常规的间接血凝试验(IHT)方法进行比较,敏感性高 4.09~26 倍。袁明龙等建立了检测鸭瘟病毒抗体的间接 ELISA 方法,与中和试验进行比较结果符合率为 100%^[10~16]。

2.5 ELISA 方法在有害微生物检测的应用

2.5.1 有害微生物快速检测技术^[1]

包括:1)快速鉴别培养基和显色培养基;2)快速测试片法;3)乳胶凝集试验;4)金标免疫分析方法;5)荧光酶免疫分析筛选方法;6)自动酶联荧光免疫检测系统(VIDAS)筛选法;7)聚合酶链反应(PCR)技术;8)DNA 探针检测法;9)ELISA 方法。上述方法各有特点,简化了操作程序,缩短了检测时间,提高了致病菌的检出率,很多方法都很成熟。AOAC 已经认可很多微生物快速检测方法,其中多数是 ELISA 方法。近几年,VIDAS 和 PCR 技术在国内进行了大量应用研究,但这两种方法的设备投入和检测成本大于 ELISA 方法。

2.5.2 ELISA 方法在有害微生物检测的应用现状

国外商品化的 ELISA 试剂盒可进行李斯特菌、沙门氏菌、大肠杆菌 O157、弯曲杆菌、假单胞菌属、致贺氏菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌、腊样芽孢杆菌等检测。国内相关的应用研究有:鄢庆彬等建立了间接 ELISA 方法,不但可用于诊断大黄鱼的溶藻弧菌病,也可以检测无病症带菌大黄鱼。赵志晶等建立了适宜食品样品中大肠杆菌 O157:H7 检测的双抗 ELISA 方法,经过增菌,鸡肉与牛奶染菌样品中的检出限为 0.1cfu/g(0.1cfu/ml)。黄金林等采用直接 ELISA 方法对 208 份鲜牛奶样品、出口龙虾样品、虾仁样品、熟食制品进行沙门氏菌检测,并用国标方法进一步验证,结果显示 ELISA 方法相对于国标法的敏感性和特异性分别为 100%、97.3%^[17~19]。

2.6 ELISA 方法在动物毒素检测的应用

2.6.1 动物毒素快速检测技术

包括:1)小白鼠生物实验法,重复性差,灵敏度低,不能判定具体的毒素成分。2)蛋白磷酸酶抑制实验法,特异性不强。3)电生理分析检测法,据报道STX(麻痹性贝类毒素的主要毒素成分)的检测限为0.0428 $\mu\text{g/g}$ 组织样品。4)ELISA方法,高灵敏度使其成为目前研究的热点。

2.6.2 ELISA 方法在动物毒素检测的应用现状

国外已有商品化的贝类毒素、鱼类毒素、淡水藻毒素ELISA方法试剂盒。如r-Biopharm公司定量检测麻痹性毒素检测试剂盒,检测下限为50PPb,回收率大约90%,10个样品的分析时间大约为2.5小时。国内的雷腊梅等建立了三种检测微囊藻毒素的酶联免疫方法,对标准品、藻样、水样及水产品中的微囊藻毒素进行了测定,其中IC ELISA检测限为7pg,重现性好,线性范围较宽,检测水产品中毒素无需富集可直接检测^[20]。

3 结束语

酶联免疫吸附方法(ELISA)适用于出口动物源性食品安全的快速检测,现在我国已经建立起自主技术创新体系,随着国内ELISA方法试剂盒稳定性、灵敏度的提高,商品化、标准化的试剂盒产品的不断涌现,检测成本的大大降低,ELISA方法将得到进一步的应用和推广。

参考文献

- [1] 王晶,王林,黄晓蓉主编.食品安全快速检测技术[M].北京,化学工业出版社.2002.
- [2] 单国强,刘雅红,康彦龙.己烯雌酚单克隆抗体细胞株的筛选及间接ELISA法的建立[J].中国兽医科技,2003,33(11):12~15.
- [3] 叶雪珠,王小骊,赵燕申等.水产品中氯霉素含量的快速检测与分析[J].食品科技,2003,8:84~85.
- [4] 关嵘,顾鸣,魏万贵等.酶联免疫法检测动物组织中磺胺嘧啶残留方法的建立[J].检验检疫科学,2004,14(1):9~11.
- [5] 张子群,李维刚,金宁等.应用酶联免疫技术检测动物源性食品中四环素类抗生素残留的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2003,3:31~33.
- [6] 李青.畜产品中青霉素残留的ELISA法测定[J].黑龙江畜牧兽医,2002,9:6~8.
- [7] 郑晶,黄晓蓉,李耀平等.鳗鱼中恩诺沙星残留量的酶联免疫检测方法[J].食品科学,2004,25(10):247~250.
- [8] 杨艳艳,王选年,魏红等.猪尿液中盐酸克伦特罗残留的ELISA法和GC-MS法检测[J].中国兽医杂志,2004,40(10):9~11.
- [9] 黎其万,潘灿平.农药残留免疫分析方法及其研究进展[J].西南农业学报,2004,17(2):248~280.
- [10] 毋艳萍.酶联免疫吸附试验对猪瘟抗体的监测[J].中国兽医科技,2003,33(9):59~60.
- [11] 潘文波,徐海聂,廖秀云等.口蹄疫合成肽酶联免疫吸附试验试剂盒在口蹄疫抗体检测中的应用[J].中国动物检疫,2001,18(12):41~43.
- [12] 黄金海,王英珍,肖锡治等.检测鸡慢性呼吸道病抗体ELISA方法的建立[J].中国预防兽医学报,2000,22(2):133~136.
- [13] 肖运才,李目力,胡思顺等.禽流感病毒夹心ELISA快速检测方法的研究[J].畜牧兽医学报,2004,35(5):536~541.
- [14] 王传彬,田新生,曹振等.H5亚型禽流感病毒单抗抗 钨天痘酶LISA的建立[J].中国实验动物学报,2004,12(4):204~207.
- [15] 黄金海,王英珍,丁伯良等.间接ELISA检测禽流感抗体方法的建立[J].动物医学进展,2001,22(2):61~64.
- [16] 袁明龙,杨永纪,诸奎龙等.鸭瘟抗体检测方法研究[J].中国预防兽医学报,2001,23(2):140~143.
- [17] 鄢庆枇,方恩华,苏永全等.大黄鱼溶藻弧菌LPS的间接ELISA检测[J].台湾海峡,2004,23(1):56~61.
- [18] 赵志晶,刘秀梅.大肠杆菌0157多克隆抗体及食品中双抗ELISA测定方法的研究[J].卫生研究,2003,32(6):606~609.
- [19] 黄金林,焦新安,文其乙等.直接ELISA和PCR相结合快速检测样品中的沙门氏菌[J].中国人兽共患病杂志,2004,20(4):321~327.
- [20] 雷腊梅,甘南琴,张小明等.三种检测微囊藻毒素的ELISA方法比较研究[J].高技术通讯,2004,7:89~92.