

徐 道,杨彩根,付监贵,等. ELISA 法检测不同条件下中华绒螯蟹中恩诺沙星的残留量[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):399-403.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.125

ELISA 法检测不同条件下中华绒螯蟹中恩诺沙星的残留量

徐 道^{1,2}, 杨彩根¹, 付监贵¹, 侍苗苗¹, 宋学宏¹

(1. 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院,江苏苏州 215123;2. 江苏中洋集团股份有限公司,江苏海安 226600)

摘要:水温 25 ℃ 时,在不同给药次数、不同健康状况条件下对中华绒螯蟹口灌恩诺沙星(10 mg/kg),应用酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定灌药后 5、10 min 及 0.5、1、2、4、8、12、24、48、96、168、240 h 中华绒螯蟹血淋巴、肌肉、肝胰腺中恩诺沙星残留量,用药代动力学软件 3P97 计算药代动力学参数并拟合房室模型。结果表明:(1)单次和多次口灌(连续口灌 3 d,1 次/d)条件下,单次口灌分布和消除快于多次口灌,各组织中恩诺沙星峰值含量从高到低依次为:肝胰腺、血淋巴、肌肉;(2)单次口灌健康的和感染嗜水气单胞菌的中华绒螯蟹后,与健康蟹相比,染菌蟹各组织中恩诺沙星含量较低、吸收较慢,但分布和消除快,恩诺沙星在染菌蟹各组织中的含量从高到低依次为:肝胰腺、肌肉、血淋巴;(3)3P97 软件分析结果表明,不同健康状况及不同口灌次数下中华绒螯蟹血淋巴、肌肉、肝胰腺中恩诺沙星的代谢规律均符合一级吸收二室开放模型。

关键词:中华绒螯蟹;恩诺沙星;ELISA;药代动力学

中图分类号: TS207 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0399-05

恩诺沙星(ENR)由德国拜尔公司创制,1987 年上市,是动物专用氟喹诺酮类药物^[1],它可以快速杀灭细菌或霉菌等具有 DNA 或 RNA 和蛋白质合成能力的病原体,并具有毒性低、抗菌谱广、细菌耐药突变率低等特点^[2]。但是 ENR 代谢缓慢,在动物体的肌肉、肝脏和肾脏等组织中易残留,长期摄入可引起关节和软骨损伤,造成泌尿系统、消化系统甚至神经系统的损害^[3]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国发展迅速、经济价值较高的优势水产品,近年来其养殖规模不断扩大,其细菌性疾病也不断暴发,ENR 的频繁使用不仅容易引起细菌的耐药性,而且导致药物残留,影响水产品的质量与安全。目前,实际生产中表明,不同的给药方式对中华绒螯蟹细菌性疾病的防治效果和药物残留有着重要影响^[4]。此外,ENR 在中华绒螯蟹上的给药方案大多是根据健康机体的药物代谢情况拟定的^[5-8],未考虑疾病因素对动物代谢的影响。但在实际养殖过程中,多数抗菌药物的使用对象是已患病的动物,且有研究表明,疾病会造成动物机体组织细胞的形态及生理代谢改变,从而影响机体对药物的吸收、分布、转化及排泄,影响药物效应^[9-10]。因此,研究疾病条件下药物在动物体内的代谢过程更具有临床意义。然而,国内外尚未见有关病理条件下中华绒螯蟹的药代动力学研究报道。为有效预防水产动物的细菌性疾病、控制药物残留,本研究用酶联免疫吸附测定(ELISA)

法进行了不同健康状况及不同口灌次数下 ENR 在中华绒螯蟹体内的药物代谢动力学研究,以期期为水产动物疾病防治中合理使用 ENR、有效控制中华绒螯蟹养殖过程中常见的细菌性疾病、保障水产品安全提供更加科学的用药依据。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂

恩诺沙星标准品(ENR,98.0%),购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;分析纯氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、柠檬酸、一水葡萄糖、活性炭、无水甲醇,购自国药集团化学试剂有限公司;Tween-20、邻苯二胺(OPD),购自北京索莱宝科技有限公司;辣根酶标记的羊抗鼠 IgG,购自美国 Bioworld 公司。

恩诺沙星鼠多抗由笔者所在实验室制备,试验用水为笔者所在实验室制备的三重蒸馏水。

磷酸盐缓冲液(PBS,pH 值 7.4):17 g 氯化钠,5.801 8 g 磷酸氢二钠,0.592 8 g 磷酸二氢钠,加三重蒸馏水定容至 2 000 mL。ACD 抗凝剂:分别将 1.32 g 柠檬酸三钠、0.48 g 柠檬酸、1.47 g 一水葡萄糖溶于 100 mL 三重蒸馏水中,再加入 0.10~0.20 g 活性炭,搅拌后静置 10 min 过滤。

1.2 仪器

高速冷冻离心机,德国 Heraeus 公司;Synergy HT 酶标仪,美国 BioTek 公司;QL-901 漩涡混合器,江苏省海门市麒麟医用仪器厂;RJ-TDL-40B-II 型低速台式大容量离心机,无锡市瑞江分析仪器有限公司;FSH-2 型可调高速匀浆机,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;FA2004A 型电子天平(精确至 0.000 1 g),上海精天电子仪器有限公司;振荡摇床,江苏省海门市麒麟医用仪器厂。

1.3 试验动物

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),购自苏州市吴中区临湖

收稿日期:2014-11-18

基金项目:江苏省苏州市应用基础项目(编号:SYN201223)。

作者简介:徐 道(1989—),男,江苏沐阳人,硕士,研究方向为水产品安全。E-mail: xuxiao_823@163.com。

通信作者:宋学宏,博士,副教授,研究方向为水产品安全。E-mail: songxh@suda.edu.cn。

现代渔业发展有限公司,体质量(22.6 ± 1.9) g,购回当天用 3% 氯化钠水溶液浸泡 3~5 min 消毒杀菌,然后置于白色聚乙烯水箱($60\text{ cm} \times 40\text{ cm} \times 35\text{ cm}$)中,水温(18 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,以自来水作为试验水源,充气泵持续充氧。每天定时吸污、换水和投喂饲料,暂养 1 周后挑选健康个体作为试验动物。

1.4 菌株

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),由江苏省水生动物疫病预防控制中心提供(编号 SC097)。

1.5 方法

1.5.1 人工感染嗜水气单胞菌的中华绒螯蟹感染模型的制备 将嗜水气单胞菌接种于 LB 培养基上,经 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,分别用质量分数 0.85% 的无菌生理盐水稀释成含量为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 CFU/mL 的菌悬液,在中华绒螯蟹第 3 步足与体壁关节膜肌肉处注射 0.1 mL。将中华绒螯蟹在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温下养殖 14 d,观察并记录中华绒螯蟹发病与死亡情况。试验期间每天按体质量投喂 1% 的中华绒螯蟹商品饲料,间歇式充氧,每天换水 1 次,每次更换约 1/3 体积,保持水体溶氧量在 5 mg/L 左右。

1.5.2 给药及取样 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温下,将恩诺沙星按 10 mg/kg 剂量口灌给药。试验前 1 d 在中华绒螯蟹第 3 步足与体壁关节膜肌肉处注射 0.1 mL 嗜水气单胞菌(用“1.5.1”节试验得出的适宜菌量),设单次口灌健康蟹为组 A、多次口灌健康蟹为组 B、单次口灌人工感染嗜水气单胞菌的中华绒螯蟹组为组 C。其中多次口灌是连续口灌 3 d,每天 1 次,于第 3 天口灌后计时采样。

各试验组给药后 5、10 min 及 0.5、1、2、4、8、12、24、48、96、168、240 h 时取样,每个时间点取样 6 只中华绒螯蟹。先抽取血淋巴,每只蟹 0.6 mL,移入装有 0.6 mL ACD 抗凝剂的 Eppendorf 管中。每个时间点在取完血淋巴后,立即解剖该组蟹并剥离心脏,随即取肝胰腺、肌肉。各样品编号后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.5.3 样品前处理 血淋巴样品:样品解冻后,充分混匀,吸取 1 mL(0.5 mL 血淋巴 + 0.5 mL ACD 抗凝剂均匀混合物)样品于 10 mL 离心管中,加入 5 mL 甲醇 - PBS(体积比 80:20)混合提取液,高速均质 2 min 后于冷冻离心机上 4 000 r/min、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,收集上清液;沉淀重复上述均质和离心操作,合并 2 次上清,再次于 10 000 r/min、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高速离心 10 min,收集上清液,稀释后待测。

肌肉和肝胰腺样品:样品解冻后,称取 1 g 中华绒螯蟹肝胰腺或肌肉样品,加 5 mL 甲醇 - PBS(体积比 80:20)混合提取液,室温下匀浆 5 min 后再涡旋 2 min、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液;沉淀重复上述提取和离心操作,合并 2 次上清液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液稀释后待测。

1.5.4 样品分析 按照笔者所在实验室选定的包被抗原 cOVA - ENR(256 ng/mL)及对照抗原 cOVA(256 ng/mL)包被 ELISA 板^[11]。洗涤、封闭等操作同文献[11],再将 1:80 000 的抗血清分别与待测样品及 1 250、250、50、10、2、0.4 ng/mL ENR 标样等体积混匀,同时设 PBS 对照,室温振荡孵育 1 h 后加入相应的孔中,每个样品设 6 个平行。根据 ENR 标准品的样品孔和对照孔的 $D_{490\text{ nm}}$ 计算抑制率,并以抑制率和 ENR 标样浓度的半对数作图绘制标准曲线,得回归方

程,计算样品中的 ENR 含量。

1.5.5 数据处理 采用 3P97 药物代谢动力学全自动分析软件,将试验数据通过计算机处理和统计分析后,得出药代动力学参数并自动拟合及选择最佳房室模型。药 - 时曲线图采用 Excel 2013 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 中华绒螯蟹嗜水气单胞菌的感染模型

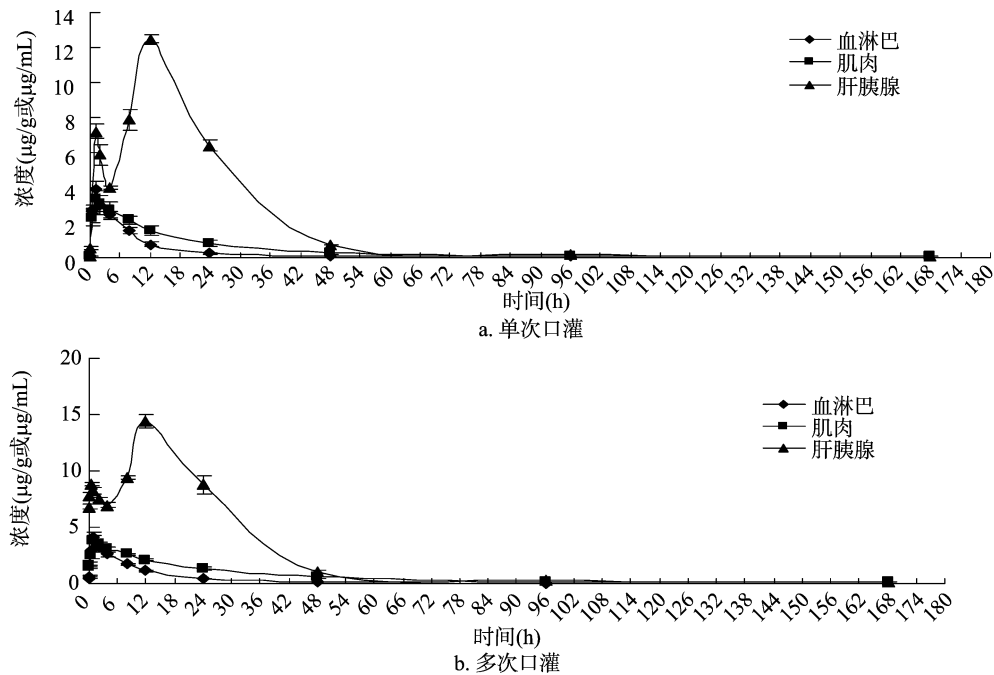
嗜水气单胞菌感染中华绒螯蟹后,病蟹腹部向上时不能自行翻身,病蟹反应迟钝,行动缓慢;腹腔内出现腹水,心脏肿大,肠中食物少,部分病蟹步足出现抖动现象;中华绒螯蟹出现的症状呈现明显的浓度依赖性,其浓度越高,病蟹发病症状越严重。病蟹死亡情况统计表明,细菌含量为 1×10^9 CFU/mL,中华绒螯蟹的成活率为 26%;细菌含量为 1×10^8 CFU/mL,中华绒螯蟹的成活率约为 50%;细菌含量为 1×10^7 CFU/mL,中华绒螯蟹的成活率为 100%。因此选择细菌含量为 1×10^7 CFU/mL 作为中华绒螯蟹嗜水气单胞菌感染模型的工作浓度。

2.2 多次口灌健康中华绒螯蟹后主要组织中恩诺沙星的药代动力学特点

单次及多次口灌给药后,ENR 在中华绒螯蟹血淋巴、肌肉、肝胰腺中的吸收、分布与代谢的过程如图 1 所示,应用 3P97 软件对所测得的药物水平 - 时间关系进行一室、二室、三室模型的数据拟合。结果表明:不同给药次数下,ENR 在中华绒螯蟹各组织中的药物浓度时间数据均可用一级吸收二室模型来描述。多次口灌给药在总的剂量上是单次口灌给药的 3 倍,即为 30 mg/kg,多次口灌下血淋巴和肌肉的代谢规律基本同单次口灌,都是呈现先上升,到 1 h 时达峰随后下降的规律,只是各个采样时间点浓度值略高于单次口灌给药。肝胰腺中,第 3 次给药 24 h 内药物含量一直处于较高值,都超过 $6\text{ }\mu\text{g/g}$,其中 12 h 时药物浓度最高,为 $14.42\text{ }\mu\text{g/g}$ 。药代动力学参数见表 1,可见单次口灌中华绒螯蟹血淋巴、肌肉、肝胰腺的吸收半衰期($T_{1/2k_a}$)分别为 0.27、0.27、2.18 h,分布半衰期($T_{1/2\alpha}$)分别为 3.65、7.39、19.86 h,消除半衰期($T_{1/2\beta}$)分别为 15.26、29.94、42.92 h;而多次口灌下 3 种组织中的 $T_{1/2k_a}$ 分别为 0.26、0.24、0.07 h, $T_{1/2\alpha}$ 分别为 3.81、9.04、23.05 h, $T_{1/2\beta}$ 分别为 18.50、33.21、48.41 h,可见单次口灌比多次口灌分布和消除都快。

2.3 恩诺沙星在感染嗜水气单胞菌的中华绒螯蟹体内的药代动力学特点

由于在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下注射 0.1 mL 含量为 1×10^7 CFU/mL 的嗜水气单胞菌时,中华绒螯蟹出现病症但没有发生死亡。因此选用这一剂量进行中华绒螯蟹的 ENR 代谢动力学研究。 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下口灌给药后,健康蟹、染菌蟹 3 种组织中 ENR 的平均药 - 时曲线见图 1 - a、图 2,主要药代动力学参数见表 2。可见健康中华绒螯蟹血淋巴、肌肉、肝胰腺的 $T_{1/2\alpha}$ 分别为 3.65、7.39、19.86 h,而在染菌蟹 3 种组织中的 $T_{1/2\alpha}$ 分别为 1.34、2.59、8.61 h,可见 ENR 在染菌蟹中的分布快于健康蟹;同样,从消除半衰期数据可见,染菌蟹对 ENR 的消除也是快于健康蟹,但是 ENR 在染菌蟹体内的吸收与分布、消除规律却不同,染菌蟹血淋巴、肌肉、肝胰腺的 $T_{1/2k_a}$ 分别为 0.87、



在血淋巴中的浓度单位为 $\mu\text{g/mL}$ ；在肌肉、肝胰腺中的浓度单位为 $\mu\text{g/g}$ 。由于240 h时测不出数据，因此图中未标示。图2同

图1 单次口灌（组A）和多次口灌（组B）健康中华绒螯蟹后主要组织中ENR的平均药时曲线（25℃）

表1 单次口灌（组A）与多次口灌（组B）中华绒螯蟹后主要组织中ENR的药代动力学参数（25℃）

组别	组织	A ($\mu\text{g/g}$)	α ($1/\text{h}$)	B ($\mu\text{g/g}$)	β ($1/\text{h}$)	K_a ($1/\text{h}$)	滞后时间 (h)	V_d/F ($\mu\text{g/g}$)	$T_{1/2\alpha}$ (h)	$T_{1/2\beta}$ (h)
单次口灌（组A）	血淋巴	3.94	0.19	0.72	0.05	2.61	0.07	2.30	3.65	15.26
	肌肉	3.01	0.09	0.77	0.02	2.53	0.07	2.74	7.39	29.94
	肝胰腺	9.31	0.04	3.11	0.02	0.32	0.01	0.89	19.86	42.92
多次口灌（组B）	血淋巴	3.68	0.18	1.03	0.04	2.67	0.07	6.76	3.81	18.50
	肌肉	2.51	0.08	1.46	0.02	2.89	0.01	7.72	9.04	33.21
	肝胰腺	0.78	13.56	9.91	0.02	9.73	0.01	3.13	23.05	48.41

组别	组织	$T_{1/2K_a}$ (h)	K_{12} ($1/\text{h}$)	K_{21} ($1/\text{h}$)	K_{10} ($1/\text{h}$)	AUC [$\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$]	CL_s [$\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$]	T_{peak} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/g}$)
单次口灌（组A）	血淋巴	0.27	0.04	0.07	0.13	34.76	0.29	1.14	3.62
	肌肉	0.27	0.02	0.04	0.06	63.71	0.16	1.43	3.27
	肝胰腺	2.18	0.01	0.02	0.03	419.94	0.02	8.15	8.80
多次口灌（组B）	血淋巴	0.26	0.05	0.07	0.10	45.92	0.65	1.16	3.75
	肌肉	0.24	0.02	0.04	0.04	101.05	0.30	1.41	3.60
	肝胰腺	0.07	0.43	13.99	0.02	548.17	0.06	0.60	9.77

注： A 为分布相的零时截距； α 为分布相消除速率常数； B 为消除相的零时截距； β 为消除相消除速率常数； K_a 为吸收速率常数； V_d/F 为表观分布容积； $T_{1/2\alpha}$ 为分布半衰期； $T_{1/2\beta}$ 为消除半衰期； $T_{1/2K_a}$ 为吸收半衰期； K_{12} 为药物由中央室到周边室内的一级运转速率常数； K_{21} 为药物由周边室到中央室的一级运转速率常数； K_{10} 为药物由中央室消除的一级运转速率常数； AUC 为血药浓度-时间曲线下面积； CL_s 为清除率； T_{peak} 为达峰时间； C_{max} 为达峰浓度。表2同。

1.35、2.56 h,健康蟹3种组织中的 $T_{1/2K_a}$ 分别为0.27、0.27、2.18 h,呈现出染菌蟹对ENR的吸收速率比健康蟹慢的趋势。

3 讨论

3.1 ELISA检测方法研究恩诺沙星在中华绒螯蟹体内的药代动力学的可行性

ELISA检测方法既可用于定性筛选,又可用于定量分析,但是由于ELISA检测方法使用抗体和酶等生物试剂、样品基

质成分复杂及免疫反应显色系统精确机制尚不明确等原因,使得ELISA检测方法可能出现一定程度的假阳性或假阴性结果^[12],所以ELISA检测方法需要用灵敏度高、检测限低、精确度较高的HPLC法确证评价。Yuan等比较了ELISA、高效液相色谱(HPLC)法在检测猪肉中环丙沙星残留时的灵敏度、精确性、准确度,结果表明,ELISA法具有高检测产出性,灵敏度、特异性均良好;而HPLC法具有良好的精密度和准确度,是一种较好的确证方法^[13]。本研究所建立的ELISA检测

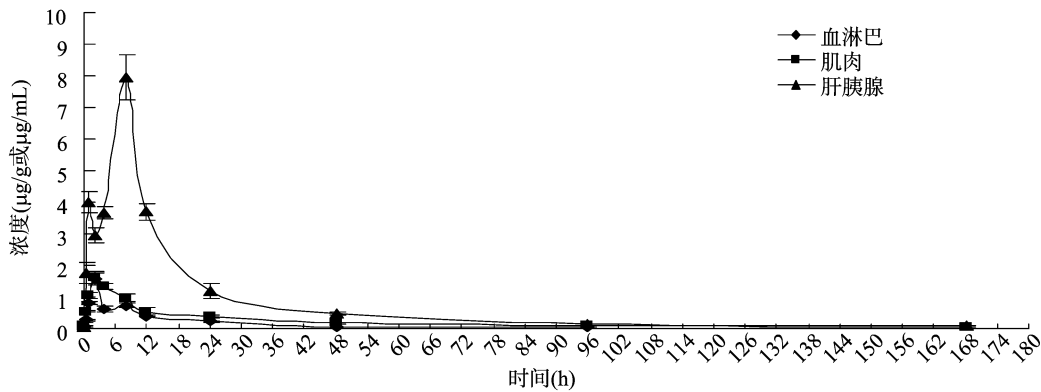


图2 单次口灌嗜水气单胞菌感染的中华绒螯蟹后主要组织中ENR的平均药时曲线(25℃)

表 2 ENR 在染菌蟹(组 C)与健康蟹(组 A)主要组织中的药代动力学参数(25℃)

组别	组织	A (μg/g)	α (1/h)	B (μg/g)	β (1/h)	K _a (1/h)	滞后时间 (h)	V _d /F (μg/g)	T _{1/2α} (h)	T _{1/2β} (h)
染菌蟹(组 C)	血淋巴	3.73	0.52	0.75	0.05	0.80	0.07	5.00	1.34	14.04
	肌肉	5.43	0.27	0.41	0.01	0.51	0.07	3.34	2.59	40.28
	肝胰腺	11.30	0.08	2.29	0.06	0.27	0.07	1.03	8.61	7.96
健康蟹(组 A)	血淋巴	3.94	0.19	0.72	0.05	2.61	0.07	2.3	3.65	15.26
	肌肉	3.01	0.09	0.77	0.02	2.53	0.07	2.74	7.39	29.94
	肝胰腺	9.31	0.04	3.11	0.02	0.32	0.01	0.89	19.86	42.92

组别	组织	T _{1/2K_a} (h)	K ₁₂ (1/h)	K ₂₁ (1/h)	K ₁₀ (1/h)	AUC [μg/(g·h)]	CL _s [μg/(g·h)]	T _{peak} (h)	C _{max} (μg/g)
染菌蟹(组 C)	血淋巴	0.87	0.23	0.21	0.12	16.70	0.60	2.05	1.09
	肌肉	1.35	0.16	0.05	0.08	39.55	0.25	2.93	1.57
	肝胰腺	2.56	0.01	0.07	0.08	125.5	0.08	6.43	5.88
健康蟹(组 A)	血淋巴	0.27	0.04	0.07	0.13	34.76	0.29	1.14	3.62
	肌肉	0.27	0.02	0.04	0.06	63.71	0.16	1.43	3.27
	肝胰腺	2.18	0.01	0.02	0.03	419.94	0.02	8.15	8.80

方法在灵敏度、检测限、准确度等方面已满足检测中华绒螯蟹体内 ENR 的要求^[11];此外,本研究在口灌条件下用 ELISA 法检测中华绒螯蟹体内各采样点 ENR 含量与余开等用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)研究的口灌 10 mg/kg ENR 在三疣梭子蟹体内的含量^[14]较为接近,代谢和消除规律也相似;另外,本试验用酶联免疫分析法测定的结果表明,ENR 在中华绒螯蟹肝胰腺的消除时间最长,依据无公害食品水产品最高残留限量(MRL)为 50 μg/kg,计算可得 ENR 在感染蟹肝胰腺中残留含量降至 50 μg/kg 水平的休药期为 375℃·d,这与王翔凌等关于 HPLC 法研究盐酸沙拉沙星在鲫鱼体内的休药期 390℃·d 的结果^[15]较接近,表明 ELISA 检测结果能够与 HPLC 结果吻合,可以作为快速筛选检测方法用于 ENR 检测。

3.2 给药方式对药物代谢的影响

水产动物常用的给药方式主要有肌肉注射、静脉注射、口灌、混饲和药浴等,同一药物随剂型、给药方式的不同,生物利用度及生物效应也会不同^[16]。静脉注射药效最快,其次是肌肉注射、口灌、混饲和药浴。在规模化集约化的池塘饲养中华绒螯蟹过程中,如果采用肌肉注射给药,在临床上不但工作量巨大,而且在给药时对养殖动物的应激也很大,不利于中华绒螯蟹的生长,因此肌肉注射给药的方式可行性极小。药浴和混饲给药操作方便,但药浴方法无法计算每只蟹的药物剂量,药代动力学研究较少采用。混饲方法存在着由于蟹摄食的个体差异,导致个体之间摄取药饵量不均匀等缺陷。本研究选

择口灌(口灌是口服的一种方式)方式研究 ENR 在中华绒螯蟹体内的药代动力学规律更符合生产实际。

有研究表明,中华绒螯蟹口灌给药方式下药物的吸收和分布慢于肌肉注射和药浴给药^[4],可能是口灌给药时,药物从口灌至胃,首次循环要经过肝胰腺,其次进入体循环,而肌肉注射给药时药物直接通过开放式循环系统进入体内各组织的分布,所以肌肉注射比口灌给药吸收分布快。药浴给药时药物进入蟹体内是一个渗透的过程,在体内比口灌更易吸收和分布。本研究对单次口灌和多次口灌 ENR 在中华绒螯蟹体内的比较研究发现,2 种给药方式下中华绒螯蟹血淋巴的分布半衰期分别为 3.65、3.81 h,消除半衰期分别为 15.26、18.50 h;肌肉中分布半衰期分别为 7.39、9.04 h,消除半衰期分别为 29.94、33.21 h,表明单次口灌比多次口灌分布和消除都快。由此说明,用 ENR 预防细菌性疾病时,采用 3~5 d 的多次给药方法,使 ENR 的有效浓度在中华绒螯蟹体内保持较长时间,预防效果会明显好于单次给药。

3.3 感染嗜水气单胞菌对恩诺沙星在中华绒螯蟹各组织代谢速率的影响

本研究表明,ENR 在人工感染嗜水气单胞菌的中华绒螯蟹血淋巴、肌肉和肝胰腺中的代谢过程均可用一级吸收二室模型来描述,这与 ENR 在人工感染溶藻弧菌的三疣梭子蟹体内药代动力学研究结果^[2]一致,也与恩诺沙星在健康的中华绒螯蟹体内的代谢过程^[5-7]较为一致。感染嗜水气单

胞菌的中华绒螯蟹各组织中 ENR 含量从高到低依次为肝胰腺、肌肉、血淋巴,与健康蟹各组织中 ENR 含量从高到低依次为肝胰腺、血淋巴、肌肉略有不同,可能与中华绒螯蟹感染嗜水气单胞菌造成其肌肉组织松散、细胞膜损伤、通透性增加、药物在肌肉组织中的渗透和积聚能力增强有关^[17]。

3.4 恩诺沙星对中华绒螯蟹细菌病的治疗作用及其休药期的制定

本研究应用 3P97 软件得到的主要药动学参数表明,ENR 在感染嗜水气单胞菌的中华绒螯蟹体内较健康组分布广泛、消除迅速,但吸收缓慢,且染菌组各组织中 ENR 含量均低于健康组,这可能与嗜水气单胞菌损伤各组织细胞有关,从而影响各组织对药物的吸收。单次口灌 ENR 10 mg/kg 后,感染嗜水气单胞菌的中华绒螯蟹血淋巴、肌肉、肝胰腺中的 ENR 含量分别在 1.0、0.5、0.5 h 高于 Roque 等研究的 ENR 对 141 株弧菌的平均最低抑菌含量 (0.45 $\mu\text{g/mL}$)^[18],且各组织中峰值含量远远高于平均最低抑菌含量,说明 ENR 对中华绒螯蟹嗜水气单胞菌导致的细菌性疾病有较好的防治效果。中华绒螯蟹的肝胰腺和肌肉都是人们特别喜爱的可食组织,本试验用酶联免疫分析法测定的结果表明,ENR 在中华绒螯蟹肝胰腺中的消除时间最长,依据无公害食品水产品最高残留限量 (MRL) 为 50 $\mu\text{g/kg}$,计算得 ENR 在感染蟹肝胰腺中残留含量降至 50 $\mu\text{g/kg}$ 水平的休药期为 375 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{d}$ 。

参考文献:

- [1] 杨雨辉,佟恒敏,卢彤岩,等. 恩诺沙星在水生动物疾病防治上应用的研究进展[J]. 水产学杂志,2003,16(1):80-82.
- [2] 余开,陈寅儿,赵青松,等. 恩诺沙星在人工感染溶藻弧菌的三疣梭子蟹体内的代谢动力学[J]. 台湾海峡,2011,30(2):257-263.
- [3] 黄金田,熊勇君,吴林坤,等. 恩诺沙星在中华绒螯蟹体内的衰减研究[J]. 水产科学,2011,30(2):112-114.
- [4] 张静波. 恩诺沙星在中华绒螯蟹体内的药物代谢动力学影响因素的研究[D]. 南京:南京农业大学,2008:34-36.
- [5] 孟勇,吴光红,朱晓华,等. RP-HPLC 同时测定中华绒螯蟹肝脏中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留[J]. 中国水产科学,2005,12(6):106-112.

(上接第 327 页)

(1) 采用人工投喂虫虫及中华鳖粉状饲料的方法,可保证饵料的充足性及适口性,提高黄颡鱼苗的开口率及摄食强度,减少空腹死亡的情况;(2) 便于对密度、溶解氧、光照度、水温、水质等生长制约因子进行合理的调节与控制;(3) 可随时观察到黄颡鱼苗的生长情况,方便管理,可及时采取有效应对措施;(4) 有效杜绝了青蛙、杂鱼、虾等敌害生物的捕食,保证了鱼苗成活率的稳定性;(5) 减少了人力、饲料、池塘及药物等方面的投入,节省了生产成本。

参考文献:

- [1] 代国庆,骆小年,徐忠源. 黄颡鱼夏花苗种池塘培育技术[J]. 中国水产,2009(2):46-47.
- [2] 黄宗文,骆剑,林彬,等. 鞍带石斑鱼工厂化育苗研究[J]. 海洋科学,2010,34(9):23-29.
- [3] 胡亚丽,王剑. 暗纹东方鲀幼鱼发育及工厂化育苗的研究[J].

- [6] 郑宗林,唐俊,喻文娟,等. RP-HPLC 法测定中华绒螯蟹主要组织中的恩诺沙星及其代谢产物[J]. 上海水产大学学报,2006,15(2):156-162.
- [7] 郑宗林,叶金明,李代金,等. 恩诺沙星及其代谢产物在中华绒螯蟹血淋巴中的比较药代动力学[J]. 海洋渔业,2011,33(1):74-82.
- [8] Tang J, Yang X L, Zheng Z L, et al. Pharmacokinetics and the active metabolite of enrofloxacin in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Aquaculture,2006,260(1/2/3/4):69-76.
- [9] 苏成业. 肝病对药代动力学的影响[J]. 生理科学进展,1983,14(3):238-242.
- [10] Baggot J D. Distribution of antimicrobial agents in normal and diseased animals[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association,1980,176(10):1085-1090.
- [11] 徐道,吴康,杨彩根,等. 恩诺沙星多克隆抗体制备技术的优化及其 ELISA 分析方法的建立[J]. 中国抗生素杂志,2014(12):914-919.
- [12] 刘春娥,林洪,曹立民,等. 恩诺沙星酶联免疫吸附检测方法 (ELISA) 的建立及其与 HPLC 方法的比较研究[J]. 中国动物检疫,2009,26(9):44-46.
- [13] Yuan Z H, Duan J S, Kong K. Comparison of an ELISA and a HPLC for determination of ciprofloxacin residues in pork[J]. Food and Agriculture Immunology,2001,13(3):199-204.
- [14] 余开,赵青松,陈寅儿,等. 恩诺沙星在三疣梭子蟹主要组织中的代谢动力学[J]. 生物学杂志,2011,28(4):21-25.
- [15] 王翔凌,方之平,操继跃,等. 盐酸沙拉沙星在鲢体内的残留及消除规律研究[J]. 水生生物学报,2006,30(2):198-203.
- [16] Agüí L, Guzmán A, Yáñez-Sedeño P, et al. Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes[J]. Analytica Chimica Acta,2002,461(1):65-73.
- [17] 袁宗辉,缪小群,尹烨华,等. 药物代谢动力学猪链球菌病模型的研制[J]. 畜牧兽医学报,1994,25(5):430-435.
- [18] Roque A, Molina-Aja A, Bolán-Mejía C, et al. *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico [J]. International Journal of Antimicrobial Agents,2001,17(5):383-387.

水利渔业,2004,24(5):34-36.

- [4] 覃政东. 江黄颡鱼工厂化育苗技术[J]. 广西水产科技,2006(4):30-32.
- [5] 林勇,杨华莲. 罗非鱼养殖技术之四奥尼罗非鱼工厂化育苗技术[J]. 中国水产,2005(6):46-48.
- [6] 李大鹏,庄平,严安生,等. 光照、水流和养殖密度对史氏鲟稚鱼摄食、行为和生长的影响[J]. 水产学报,2004,28(1):54-61.
- [7] 黄宁宇,夏连军,么宗利,等. 养殖密度和温度对瓦氏黄颡鱼幼鱼生长影响实验研究[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2005,24(3):208-212,248.
- [8] 王志强,庞守忠. 黄颡鱼仔稚鱼发育和摄食习性研究[J]. 江苏农业科学,2009(6):311-313.
- [9] 章晓炜,汪雯翰,郑聪. 黄颡鱼仔鱼食性及生长的研究[J]. 水产科学,2002,21(3):13-15.
- [10] 黄权,姜凤,齐科种,等. 投喂虫虫无节幼体条件下黄颡鱼仔稚鱼生长、存活率、摄食力和体成分的变化[J]. 中国水产科学,2012(6):1034-1042.