

مطالعه مقدماتی وجود باقیمانده آنتی بیوتیک جنتامایسین در بافت های مرغ گوشتی در شهر سمنان

شهرزبان، ا.^۱، خوش گنار، ج.^۲.

دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۰

خلاصه

به منظور ارزیابی خطر باقیمانده های آنتی بیوتیکی با منشاء دامی ابتدا باید اندازه گیری، پایش و غربالگری منظم آنها در گوشت ها و فرآورده های گوشتی مورد مصرف انسان انجام شود. حضور باقیمانده ها بیشتر از حداقل سطح باقیمانده (MRL) در این نوع محصولات که مورد مصرف مداوم می باشد، عوارض ناگواری در انسان در طولانی مدت ایجاد می کند. در این مطالعه در مجموع ۴۳ نمونه بافت عضله و کبد از کشتارگاه طیور شهر سمنان در مدت یک ماه جمع آوری و به منظور ارزیابی باقیمانده آنتی بیوتیکی جنتامایسین از روش الایزا استفاده گردید. محدودیت اندازه گیری (LOD) جنتامایسین بر اساس دستورالعمل کیت سازنده 10 ng/g بود. از ۲۱ نمونه بافت عضلانی و ۲۲ نمونه بافت کبدی، به ترتیب ۵۰ و ۷۱/۴۲ درصد نمونه ها حاوی باقیمانده جنتامایسین بودند. حداکثر میزان باقیمانده در گوشت و کبد طیور بر اساس استانداردهای کدکس 100 ng/g می باشد که بر اساس آن، به ترتیب ۷۸/۵۷ و ۱۰۰ درصد نمونه های گوشت و کبد میزان باقیمانده ای بیش از حد استاندارد داشتند. رعایت نکردن مدت زمان منع مصرف (Withdrawal Time) باعث حضور باقیمانده ها در فرآورده های با منشاء دامی می شود. لذا به منظور جلوگیری از مواجهه مداوم باقیمانده ها پایش مدون و منظم داروهای دامپزشکی که با بهداشت و سلامت انسانی سر و کار دارد باید توسط سایر نهادهای مربوطه در دستور کار قرار گیرد.

واژه های کلیدی: باقیمانده جنتامایسین، الایزا، مرغ گوشتی.

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۲. دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

*نویسنده مسؤل: Shahroozian@semnan.ac.ir

های نظارتی منظمی را برای به حداقل رساندن استفاده مجاز این دسته از داروها در محصولات خوراکی با منشاء دامی تدوین و اجرا کرده اند. متأسفانه در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران چنین برنامه های نظارتی به صورت منظم وجود ندارد و طرح های انجام شده پایش آنتی بیوتیک ها به خاطر پاره ای از سیاست ها منتشر و ارائه نمی گردد. به منظور ارزیابی دوز مواجهه در انسان در رده های مختلف سنی نیاز به ارزیابی و اندازه گیری حضور باقیمانده ها در گوشت و فرآورده های گوشتی می باشد. بدین منظور در وحله اول نیاز به سیستم ها و روش های اندازه گیری مطمئن و منظم به منظور آگاهی و اطلاع از حضور باقیمانده ها و سپس اندازه گیری ارزیابی دوز مواجهه خوراکی روزانه می باشد (Prescott, 1999).

مواد و روش کار

در این تحقیق از کیت الیازی اندازه گیری کمی جنتامایسین شرکت یوروپروکسیما (Europroxima)، که حاوی محلول های استاندارد جنتامایسین در غلظت های (ng/ml) صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰، بافر رقیق کننده، بافر شستشو، محلول متوقف کننده، کونژوگ و آنتی بادی می باشد، استفاده شده است.

نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه

تعداد ۲۱ نمونه بافت ماهیچه و ۲۲ نمونه بافت کبد از کشتارگاه طیور شهر سمنان در دیماه سال ۱۳۹۳ جمع آوری شد و در مجاورت یخ در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال گردید. در آزمایشگاه، یک گرم نمونه گوشت یا کبد وزن شد و در لوله های پلاستیکی هموژنیزه شد، سپس ۶ میلی لیتر محلول ۳٪ اسید تری کلرو استیک اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه هموژنیزاسیون انجام شد. نمونه ها ۳۰ دقیقه با استفاده از شیکر مخلوط شدند سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و لایه چربی برداشته شد و لوله فیلتر را داخل لوله پلاستیکی قرار داده و ۱۵۰ میکرولیتر مایع را از داخل لوله پلاستیکی برداشته و ۹۵۰ میکرولیتر SDB (g ۱/۱۵ Na₂HPO₄، ۱/g۲ KH₂PO₄، ۰/۲ g KCL، ۳۰ NaCl، ۰/۵ ml Tween 80) را در یک لیتر آب حل نموده و pH آن ۷/۴ می باشد) به آن اضافه و مخلوط شد. pH در محدوده ۷/۴±۰/۴ تنظیم شد. ۵۰ میکرولیتر از این محلول را برداشته و در داخل پلیت میکروتیتر قرار داده شد. مطابق دستورالعمل کیت جنتامایسین بقیه مراحل آزمایش اجرا شد و به کمک دستگاه خوانشگر الیزا در طول موج ۴۵۰ nm قرائت انجام شد.

برای محاسبه و تفسیر نتایج مقدار جذب نوری نمونه ها (میانگین دو تکرار) و استانداردها بر جذب نوری استاندارد صفر که بیشترین جذب را دارد (۱۰۰٪) تقسیم نموده و در ۱۰۰ ضرب کردیم. مقدار

آنتی بیوتیک ها موادی هستند که باعث کشتن یا مهار رشد باکتری های بیماریزا و مضر در بدن می شوند. آنتی بیوتیک ها در بخش دامپزشکی به دلایل مختلف مورد استفاده قرار می گیرند. از آنها به منظور پیشگیری، درمان و نیز به عنوان محرک رشد استفاده می شود. در صنعت طیور، استفاده از آنتی بیوتیک ها باعث افزایش کارآمدی در تولید و افزایش میزان سلامت گله و کاهش تلفات ناشی از بیماری ها می شود، اما متأسفانه بافت های خوراکی طیور می تواند با غلظت های مضر این آنتی بیوتیک ها آلوده شود. باقیمانده های دارویی دامپزشکی بالاتر از حداکثر سطح باقیمانده (MRL) باعث اثرات زیان آور و مضر بر بهداشت و سلامت انسانی می شود. طیف این اثرات گسترده است و می تواند از سرطانزایی، ناقص الخلقه زایی و آلرژی تا مقاومت دارویی و تغییر فلور گوارشی باشد (Gehring و همکاران، ۲۰۰۵؛ Shareef و همکاران، ۲۰۰۹). جنتامایسین از دسته آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی است که به علت بروز مقاومت دارویی به خصوص در نسل های قدیمی تر و همچنین توانایی ایجاد اثرات سمی استفاده آن محدود شده است. ولی این دسته هنوز علیه باکتری های گرم منفی ایجاد کننده بیماری در دامها به صورت گسترده مورد استفاده قرار می گیرد و یک باقیمانده آنتی بیوتیکی شایع در مواد غذایی با منشاء دامی می باشد. (Gehring و همکاران، ۲۰۰۵).

این دسته آنتی بیوتیکی از طریق خوراکی به طور ضعیف جذب می شود و بعد از جذب سریعاً در مایعات خارج سلولی منتشر شده و مقدار کمی از آن به پروتئین های پلاسما متصل می شود. حذف آن از طریق فیلتراسیون گلوبولینی صورت می گیرد و دارو در ادرار به صورت تغییر نیافته دفع می شود. بیشترین غلظت این دسته آنتی بیوتیکی در کلیه و بعد از آن در کبد و گوشت گزارش شده است (Gehring و همکاران، ۲۰۰۵؛ McGlinchey و همکاران، ۲۰۰۸).

اثرات سمی مهم آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی سمیت کلیوی و سمیت گوش می باشد که به علت فراهمی زیستی کم خوراکی این داروها زیاد در ارتباط با ایمنی غذایی انسان نیست. نتایج مطالعات جهش زایی، سمیت ژنتیکی و تولید مثلی نشان داده است که آمینوگلیکوزیدها سرطان زا یا ناقص الخلقه زا نیستند، اگرچه سمیت جنینی برای جنتامایسین گزارش شده است. به نظر می رسد بیشترین اثر جانبی این گروه از آنتی بیوتیک ها علاوه بر مقاومت دارویی در ارتباط با میکروفلور روده انسان به خصوص نوزادان می باشد (Gehring و همکاران، ۲۰۰۵؛ Toldrá و Reig، ۲۰۰۶). در کشورهای پیشرفته، سازمانهای دامپزشکی و دیگر نهادها سیاست

بودند، که از تعداد نمونه های مثبت بافت عضله، ۷۸/۵۷ درصد و نمونه های کبدی ۱۰۰ درصد بالاتر از حداکثر میزان باقیمانده (MRL) داشتند. میانگین باقیمانده آنتی بیوتیکی جنتامایسین در عضله $87/57 \pm 59/15$ و میانگین باقیمانده جنتامایسین کبدی $76/4 \pm 84/146$ بود (جدول ۱). حداکثر سطح باقیمانده آنتی بیوتیک جنتامایسین برای عضله و کبد 100 ng/g بر اساس سی و پنجمین جلسه کمیسیون غذایی کدکس تعیین شده بود. همان طور که در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده، غلظت های بالاتر از 100 ng/g توسط خط افقی مشخص گردیده است.

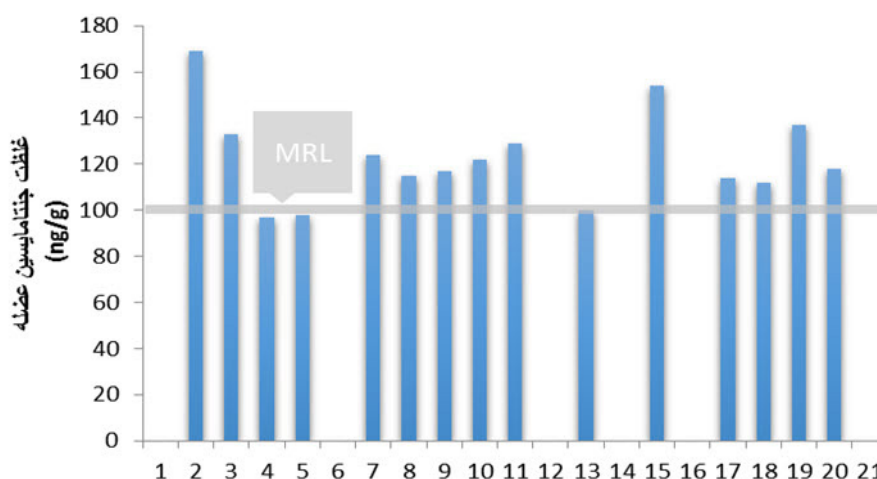
جذب نوری بقیه موارد به صورت درصدی از جذب حداکثر بیان شد. مقادیر محاسبه شده برای استانداردها در محور عرضی و غلظت های معادل جنتامایسین (ng/ml) در محور افقی نقطه گذاری شدند.

نتایج

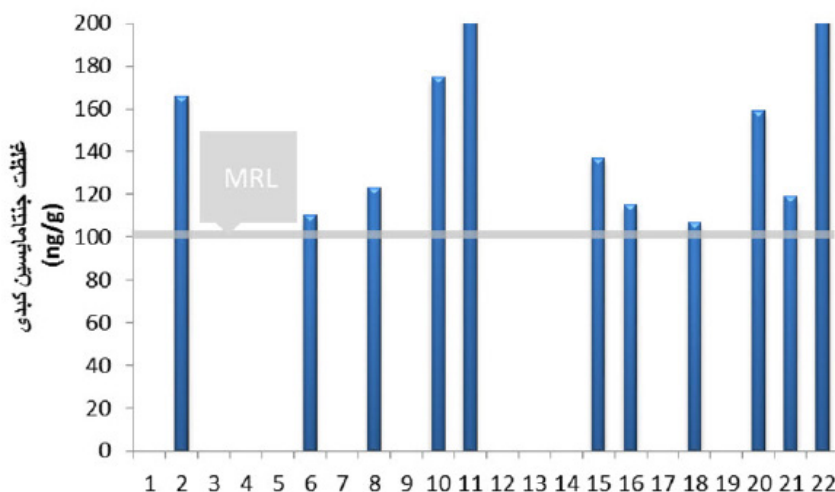
با توجه به اینکه محدودیت قابل اندازه گیری (LOD) کیت الیزای جنتامایسین بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده 10 ng/g می باشد، از مجموع ۴۳ نمونه بررسی شده (۲۱ نمونه بافت عضلانی، ۲۲ نمونه بافت کبدی)، ۵۰ درصد نمونه های بافت عضلانی و $71/42$ درصد نمونه های کبدی حاوی باقیمانده آنتی بیوتیکی جنتامایسین

کبد (ng/g)	عضله (ng/g)	
$76/4 \pm 84/6$	$87/57 \pm 59/15$	میانگین \pm انحراف معیار
۷۱/۴۲	۵۰	درصد نمونه های مثبت
۱۰۰	۷۸/۵۷	درصد نمونه های بالاتر از حد استاندارد

جدول ۱. میانگین \pm انحراف معیار باقیمانده آنتی بیوتیکی جنتامایسین در بافت عضله و کبد



شکل ۱. حداکثر سطح باقیمانده آنتی بیوتیک جنتامایسین در نمونه های عضله



شکل ۲. حداکثر سطح باقیمانده آنتی بیوتیک جنتامایسین در نمونه های کبد

بحث

روش های گوناگونی برای تعیین میزان باقیمانده در گوشت طیور مورد استفاده قرار می گیرد که از آن جمله می توان به روش چهار پلیت (FPT)، روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و روش الایزا (ELISA) اشاره نمود (McGlinchey و همکاران، ۲۰۰۸؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۸؛ Pikkemaat و همکاران، ۲۰۰۸؛ Shohreh، ۲۰۰۶؛ Shareef و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین باید اشاره نمود که الگوی مصرف آنتی بیوتیک ها در هر منطقه و هر آب و هوایی متغیر است. اگر آنتی بیوتیک جنتامایسین به صورت خوراکی مصرف شود همانطور که اشاره شد به دلیل جذب ضعیف گوارشی وارد گردش عمومی خون و بدن نمی شود و بنابراین غلظت های قابل اندازه گیری در بافت ایجاد نمی کند، اما اگر به صورت تزریقی استفاده شود، سریعاً در بدن منتشر شده و غلظت های قابل اندازه گیری در بافت ها ایجاد می کند (Prescott، ۱۹۹۹؛ Gehring و همکاران، ۲۰۰۵؛ McGlinchey و همکاران، ۲۰۰۸). اما واقعیتی که در حال حاضر دارای اهمیت فراوان است شیوع استفاده از آنتی بیوتیک های تزریقی به خصوص جنتامایسین آن هم در اواخر دوره پرورش طیور (یک هفته قبل از کشتار) به خصوص در فصل سرما است و بنابراین مدت زمان منع کشتار که برای جنتامایسین ۳۵ روز است رعایت نشده و تقریباً اکثر گوشت های طیور آلوده به این آنتی بیوتیک هستند (Gehring و همکاران، ۲۰۰۵). لذا پایش منظم میزان باقیمانده های داوربی دامپزشکی توسط نهادهای مربوطه به طور منظم باید انجام شود و متعاقب آن باید تصمیمات و سیاست هایی در ارتباط با منع مصرف این داروها و یا رعایت دوره منع کشتار اتخاذ گردد.

روش های گوناگونی برای تعیین میزان باقیمانده در گوشت طیور مورد استفاده قرار می گیرد که از آن جمله می توان به روش چهار پلیت (FPT)، روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و روش الایزا (ELISA) اشاره نمود (McGlinchey و همکاران، ۲۰۰۸؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۸؛ Pikkemaat و همکاران، ۲۰۰۸؛ Shohreh، ۲۰۰۶؛ Shareef و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین باید اشاره نمود که الگوی مصرف آنتی بیوتیک ها در هر منطقه و هر آب و هوایی متغیر است. اگر آنتی بیوتیک جنتامایسین به صورت خوراکی مصرف شود همانطور که اشاره شد به دلیل جذب ضعیف گوارشی وارد گردش عمومی خون و بدن نمی شود و بنابراین غلظت های قابل اندازه گیری در بافت ایجاد نمی کند، اما اگر به صورت تزریقی استفاده شود، سریعاً در بدن منتشر شده و غلظت های قابل اندازه گیری در بافت ها ایجاد می کند (Prescott، ۱۹۹۹؛ Gehring و همکاران، ۲۰۰۵؛ McGlinchey و همکاران، ۲۰۰۸). اما واقعیتی که در حال حاضر دارای اهمیت فراوان است شیوع استفاده از آنتی بیوتیک های تزریقی به خصوص جنتامایسین آن هم در اواخر دوره پرورش طیور (یک هفته قبل از کشتار) به خصوص در فصل سرما است و بنابراین مدت زمان منع کشتار که برای جنتامایسین ۳۵ روز است رعایت نشده و تقریباً اکثر گوشت های طیور آلوده به این آنتی بیوتیک هستند (Gehring و همکاران، ۲۰۰۵). لذا پایش منظم میزان باقیمانده های داوربی دامپزشکی توسط نهادهای مربوطه به طور منظم باید انجام شود و متعاقب آن باید تصمیمات و سیاست هایی در ارتباط با منع مصرف این داروها و یا رعایت دوره منع کشتار اتخاذ گردد.

نتایج این تحقیق نشان داد که ۵۰ درصد نمونه های جمع آوری شده بافت عضلانی و ۷۱/۴۲ درصد نمونه های بافت کبدی به لحاظ وجود باقیمانده آنتی بیوتیک جنتامایسین به روش الایزا مثبت تشخیص داده شدند که از بین نمونه های مثبت در بافت عضلانی ۷۸/۵۷ درصد و در بافت کبد ۱۰۰ درصد غلظت هایی بالاتر از حداکثر میزان باقیمانده داشتند (۱۰۰ ng/g) داشتند. در مطالعات دیگر توسط تاجیک و شهره و همچنین شریف و همکاران از روش TLC برای تعیین حضور باقیمانده های آنتی بیوتیکی در نمونه



A preliminary study of gentamicin residual poultry products in semnan city

shahroozian, E.^{1*}, khoshgoftar, J.².

Received:03.10.2015

Accepted: 31.12.2015

Abstract

In order to risk assessment of antibiotics residues in animal originated food, first, it is necessary to be measurement, survey and screen of meat products that man consumed. Presence of antimicrobial residues in animal originated food regularly greater than minimum residues levels (MRLs) cause adverse effect in human. In this study, 43 samples of poultry meat and liver collected from poultry slaughter in semnan city in the second half of the year of 1393 and use ELISA method in order to evaluate gentamicin residues. Limitation of detection (LOD) for gentamicin was 10 ng/g according to kit manufacture instruction. 21 and 22 samples of muscle, liver tissue, were contained, 50 and 71.42% of the samples gentamicin residues respectively. The minimum amount of residual in meat and liver is 100 ng /g according to Codex standards, which 78.57 % and 100% of the meat and liver samples had more than the standard levels respectively. Not respecting the withdrawal period (Withdrawal Time) will be the presence of residues in products of animal origin. Systematic and regular monitoring of veterinary drugs should be placed on the agenda by relevant agencies to avoid continuous exposure to residues of veterinary drugs, that deal with human health.

Key words: ELISA, poultry meat, Gentamicin residues, ELISA, poultry meat.

1. Department of Basic Science Veterinary faculty, Semnan University, Semnan, Iran.

2. Graduated of Veterinary faculty, Shahid Bahonar University of kerman, Kerman, Iran.

*Corresponding author: Shahroozian@semnan.ac.ir

- Chen**, Y., Shang, Y., Li, X., Wu, X., Xiao, X. 2008. Development of an enzyme-linked immunoassay for the detection of gentamicin in swine tissues. *Food Chemistry*, **108**, 304-309.
- Dey**, B.P., Thaker, N.H., Bright, S.A., Thaler, A.M. 2005. Fast antimicrobial screen test (FAST): improved screen test for detecting antimicrobial residues in meat tissue. *Journal of AOAC International*, **88**, 447-454.
- Gehring**, R., Haskell, S.R., Payne, M.A., Craigmill, A.L., Webb, A.I., Riviere, J.E. 2005. Aminoglycoside residues in food of animal origin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **227**, 63-66.
- McGlinchey**, T.A., Rafter, P.A., Regan, F., McMahon, G.P. 2008. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Analytica Chimica Acta*, **624**, 1-15.
- Mitchell**, J., Griffiths, M., McEwen, S., McNab, W., Yee, A. 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *Journal of Food Protection*, **61**, 742-756.
- Pikkemaat**, M.G., Dijk, S.O.V., Schouten, J., Rapallini, M., van Egmond, H.J. 2008. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening). *Food control*, **19**, 781-789.
- Prescott**, J.F. (reviewer). 1999. *The Use of Drugs in Food Animals: Benefits and Risks*. National Academy Press, Washington, D.C, USA.
- Shaikh**, B., Moats, W.A. 1993. Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. *Journal of Chromatography A*, **643**, 369-378.
- Shareef**, A., Jamel, Z., Yonis, K. 2009. Detection of antibiotic residues in stored poultry products. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, **23**, 45-48.
- Tajick**, M., Shohreh, B. 2006. Detection of antibiotics residue in chicken meat using TLC. *International Journal of Poultry Science*, **5**, 611-612. <https://doi.org/10.3923/ijps.2006.611.612>
- Toldra**, F., Reig, M. 2006. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 482-489.
- Wang**, S., Xu, B., Zhang, Y., He, J. 2009. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney. *Meat science*, **82**, 53-58.