

مطالعه باقی مانده کلرامفنیکل در گوشت طیور به روش الایزا در اصفهان

ابراهیم رحیمی^{۱*}، محسن جعفریان^۲

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: ebrahimrahimi55@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۸۷/۸/۸، پذیرش نهایی: ۸۷/۱۲/۲۲)

چکیده

کلرامفنیکل از گروه داروهای وسیع الطیف دامپزشکی محسوب می شود که در درمان عفونت های ریوی در صنعت طیور استفاده می گردد. حتی سطوح پایین باقی مانده کلرامفنیکل ممکن است به یک نوع کم کاری و تحلیل مغز استخوان منجر و نهایتاً به کم خونی آناپلاستیک تبدیل گردد. مطالعه حاضر با هدف تعیین باقی مانده کلرامفنیکل در گوشت مرغ انجام شد. غلظت کلرامفنیکل در این مقاله با استفاده از روش الایزا در ۱۴۰ نمونه گوشت مرغ (عضله ران) عرضه شده به بازار مصرف شهرستان اصفهان اندازه گیری شد. در ۲۵ نمونه از ۱۴۰ نمونه (۱۷/۹ درصد) بررسی شده، حضور باقی مانده کلرامفنیکل در غلظتی مابین ۱۴ تا ۳۱۱ نانوگرم در کیلوگرم با میانگین ۹۷/۹ نانوگرم در کیلوگرم و انحراف معیار ۱۷/۷ نانوگرم در کیلوگرم مشاهده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که علی رغم پایین بودن غلظت باقی مانده کلرامفنیکل در نمونه ها، لکن این دارو در حال حاضر در صنعت پرورش طیور استفاده می شود و این می تواند به عنوان خطری برای سلامت جامعه محسوب شود.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۷، دوره ۲، شماره ۳، ۲۰۷-۲۰۳.

کلمات کلیدی: آنتی بیوتیک، کلرامفنیکل، گوشت، طیور، الایزا

مقدمه

جانبی و دوره دفع دارویی علاوه بر دامپزشکان توسط تکنسین های دامپزشکی و حتی خود دامداران، به عنوان درمان، پیشگیری، محرک رشد و گاهی نگه دارنده مواد غذایی در صنعت پرورش طیور مورد استفاده قرار می گیرند و از نگرانی های عمده که در این رابطه وجود دارد، حضور بقایای آنتی بیوتیکی در گوشت و تخم این موجودات است. باقی مانده این داروها در مواد غذایی مورد مصرف انسان اثرات سوء و زیان بخشی برای مصرف کننده به همراه دارد، عوارضی چون حساسیت، اختلالات متابولیکی، واکنش های سمی و مهم تر از

گوشت طیور به عنوان یکی از مهم ترین منابع تأمین کننده نیازهای پروتئین حیوانی در تغذیه جوامع انسانی به شمار می رود و در این میان گوشت مرغ ارزان ترین نوع گوشت در اکثر کشورهاست و بدون شک مهم ترین دلیل موفقیت این صنعت در سرتاسر جهان است (۵). این برتری در رقابت، اساساً به دلیل بهبود ممتد بازده تولید و پذیرش ایده ها و ابداعات نو توسط تولیدکنندگان است. در این میان به علت کارایی بالایی که آنتی بیوتیک ها در درمان و پیش گیری از بیماری ها دارند، متأسفانه انواع مختلفی از آن ها بدون در نظر گرفتن عوارض

همه پیدایش سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد (۳، ۸ و ۱۳).

یکی از این آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیفی که استفاده از آن در دامپزشکی ممنوع اعلام و حداکثر محدوده باقی مانده آن در مواد غذایی مصرفی انسان در اتحادیه اروپا صفر در نظر گرفته شده است، کلرامفنیکل^۱ می‌باشد (۱۱). ولی به نظر می‌رسد به‌طور بی‌رویه و وسیع در صنعت پرورش طیور گوشتی استفاده می‌گردد. دپرسیون مغز استخوان^۲ که می‌تواند در تعداد کمی از بیماران کشنده باشد و سندرم خاکستری^۳ در نوزادان تازه متولد شده به دلیل کمبود اسید گلوکورونیک^۴ از عوارض عمده تجویز کلرامفنیکل برای انسان است. از طرفی توسعه کم خونی آپلاستیک^۵، خطری جدی در رابطه با تجویز کلرامفنیکل به هر روشی در انسان می‌باشد (۳، ۱۱ و ۱۳).

با توجه به مطالعات فراوانی که در خصوص باقی مانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی از جمله گوشت طیور در ایران انجام شده است، اما اکثر آن‌ها کیفی بوده و کمتر میزان و نوع آنتی‌بیوتیک باقی مانده مورد بررسی قرار گرفته است. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی وضعیت حضور و میزان باقی مانده آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل در گوشت طیور استفاده شده در بازار مصرف اصفهان، طراحی و انجام شده است.

مواد و روش کار

در این مطالعه طی مدت ۶ ماه، از پائیز ۱۳۸۶ الی فروردین ۱۳۸۷، در مجموع ۱۴۰ نمونه عضله ران مرغ از خرده فروشی‌های مواد غذایی سطح شهر اصفهان جمع‌آوری شد که در اسرع وقت در کنار یخ به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد ارسال گردید. این نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در شرایط انجماد (18°C) - نگه‌داری شدند.

بررسی حضور باقی مانده کلرامفنیکل در نمونه‌ها به روش الایزا و با استفاده از کیت اختصاصی آن (R-Biopharm, Germany) انجام شد.

مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت حدود ۱۰۰ گرم از هر نمونه گوشت مرغ به صورت همگن درآورده شد. سه گرم از نمونه همگن و با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن و با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و سپس ۶ میلی‌لیتر اتیل استات مخلوط گردید. نمونه‌های مذکور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی برداشته شد. در ادامه، مایع مذکور در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. سپس ۱ میلی‌لیتر، n-هگزان و به دنبال آن ۰/۵ میلی‌لیتر بافر به لوله‌های مذکور اضافه شد و پس از مخلوط شدن روی شیکر در حرارت ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز آبی (فاز پائینی) به عنوان نمونه آماده‌سازی شده جهت ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

پنج‌میکرولیتر از محلول‌های استاندارد و نمونه‌های آماده‌سازی شده به حفره‌های میکروپلیت منتقل شد و به دنبال آن ۵۰ میکرولیتر از آنزیم کونژوگه رقیق شده به حفره اضافه گردید. بعد از قرار دادن میکروپلیت در حرارت ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی به مدت یک ساعت، مایع موجود در میکروپلیت خارج شد و با قرار دادن آن به شکل وارونه بر روی کاغذهای جاذب رطوبت و ضربه زدن ملایم به آن مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه شد. سپس حفره‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شسته شدند (عمل شستشو دوبار تکرار گردید) و هر بار بعد از تخلیه مایع شستشو، میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار گرفت تا کاملاً باقی مانده مایع شستشو خارج شود. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به هر حفره اضافه گردید و میکروپلیت به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت برای توقف واکنش، محلول قطع واکنش به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌ها اضافه شد.

¹ Chloramphenicol

² Bone marrow depression

³ Gray syndrome

⁴ Glucuronic acid

⁵ Anaplastic anemia

میزان جذب (OD) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (StatFax-2100, UK) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد و با تقسیم میزان جذب نمونه‌ها و استانداردها بر میزان جذب استاندارد صفر، ضرب در ۱۰۰، درصد جذب به دست آمد. براساس درصد جذب نمونه‌های استاندارد، منحنی کالیبراسیون بر روی کاغذهای شطرنجی رسم و به دنبال آن بر اساس درصد جذب نوری هر نمونه و انطباق با منحنی کالیبراسیون، میزان کلرامفنیکل برحسب نانوگرم در کیلوگرم به دست آمد. داده‌های به دست آمده به کمک نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۱۵ در سطح آمار توصیفی مورد تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

با روش الایزا، از ۱۴۰ نمونه گوشت مرغ (عضله ران) مورد مطالعه، ۲۵ نمونه (۱۷/۸۹ درصد) آلوده به کلرامفنیکل تشخیص داده شدند و مابقی شامل ۱۱۵ نمونه (۸۲/۱ درصد) از این نظر منفی بودند. میانگین و انحراف معیار باقی مانده کلرامفنیکل در نمونه‌های آلوده به ترتیب ۹۷/۲ و ۱۷/۷ نانوگرم در کیلوگرم به دست آمد. حداقل و حداکثر این میزان به ترتیب ۱۳ و ۳۱۱ نانوگرم در کیلوگرم بود. بررسی محدوده باقی مانده کلرامفنیکل در نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که میزان باقی مانده کلرامفنیکل در ۵ نمونه (۲۰ درصد) بین ۱۳-۳۰ نانوگرم در کیلوگرم، ۷ نمونه (۲۸ درصد) بین ۶۰-۳۱ نانوگرم در کیلوگرم، ۵ نمونه (۲۰ درصد) بین ۹۰-۶۱ نانوگرم در کیلوگرم، ۱ نمونه (۴ درصد) بین ۱۲۰-۹۱ نانوگرم در کیلوگرم و ۷ نمونه (۲۸ درصد) حاوی بیش از ۱۲۱ نانوگرم در کیلوگرم بوده است.

بحث و نتیجه گیری

از مهم‌ترین آلاینده‌های شیمیایی مواد غذایی که از اهمیت بسیار بالایی در سلامت انسان برخوردارند، باقی مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی هستند، که متأسفانه استفاده از این ترکیبات به طور روزافزونی در صنعت دامپروری و پرورش

طیور رونق یافته است و از همه مهم‌تر این‌که در بسیاری از موارد دامداران یا مرغداران بدون توجه به سمیت، خطرات و چگونگی قابلیت مصرف دارو، خودسرانه و بدون مشورت با دامپزشک به طرز بی‌رویه و حتی چندین برابر دز معمول از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت پیشگیری و درمان دام‌ها، خصوصاً طیور صنعتی استفاده می‌نمایند. از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی که امروزه استفاده از آن در صنعت دامپروری، دامپزشکی و حتی پزشکی ممنوع شده است، کلرامفنیکل می‌باشد (۱۱). اما متأسفانه نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصدی از نمونه‌های بررسی شده آلوده به کلرامفنیکل، با میزان‌های متفاوت بوده است. در این مطالعه از ۱۴۰ نمونه عضله ران مرغ‌های مصرفی اصفهان ۲۵ نمونه (۱۷/۹ درصد) آلوده به کلرامفنیکل بوده‌اند. با توجه به این‌که بقایای آنتی‌بیوتیکی بیشتر در اندام‌های دفعی از جمله کبد و کلیه تجمع یافته (۱۱) و در بافت‌های عضلانی بسیار کم یافت می‌شوند، انتظار می‌رود میزان باقی مانده دارو در بافت‌های کبد و کلیه بیشتر باشد. طی مطالعه‌ای توسط مطلبی در سال ۱۳۸۳ در خصوص بررسی کیفی باقی مانده داروهای آنتی‌بیوتیکی در میگوی پرورشی ایران، نشان داده شده است که باقی مانده کلرامفنیکل در تمام نمونه‌های مورد بررسی (۴۲ نمونه) زیر ۲ میکروگرم در کیلوگرم بوده است. در این مطالعه مشخص گردید که استفاده از کلرامفنیکل و میزان باقی مانده آن در گوشت میگو طی سال‌های ۲۰۰۰ میلادی به بعد به‌طور چشمگیری کاهش یافته است (۷).

ترکان و همکاران در سال ۱۳۸۰ طی مطالعه‌ای در اصفهان جهت بررسی باقی مانده‌های دارویی در گوشت، کبد و کلیه مرغ‌های کشتار شده به روش چهار پلیت، نشان دادند که ۲۳۷ لاشه از ۲۵۰ نمونه مورد مطالعه (۹۴/۸ درصد) حاوی باقی مانده‌های آنتی‌بیوتیکی بوده‌اند (۲). پرونده در سال ۱۳۷۵ با استفاده از روش چهار پلیت، ۲۵۰ نمونه از لاشه‌های طیور کشتار شده در کشتارگاه‌های طیور در اطراف شیراز که قابل مصرف تشخیص داده شده بودند را مورد بررسی قرار داد. نتایج

باعث شده است تا متأسفانه باقی مانده این داروها در مواد غذایی به طور قابل ملاحظه‌ای مشاهده شود (۱، ۴، ۹ و ۱۴).

در ارتباط با میزان باقی مانده آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌خصوص کلرامفنیکل در لاشه‌های طیور، نظر F.D.A بر این است که هیچ‌گونه باقی مانده‌ای در لاشه‌ها وجود نداشته باشد و به عبارتی میزان باقی مانده آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله کلرامفنیکل صفر باشد. بنابراین قوانین و مقرراتی درخصوص کنترل آلودگی مواد غذایی به آنتی‌بیوتیک‌ها و عرضه مواد غذایی سالم در تعداد زیادی از کشورهای جهان وضع گردیده است (۶، ۱۰ و ۱۱). برای مثال در آلمان یک درصد لاشه‌های گاوهای گوشتی و دو درصد لاشه‌های گوساله‌های کشتار شده باید به این منظور آزمایش شوند و یا احشاء خوراکی که به صورت وارداتی وارد انگلستان می‌شوند قبل از توزیع در بازار می‌باید توسط آزمایشگاه‌های وابسته به دولت، آلودگی آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها ارزیابی گردد (۱۵). اما با کمال تأسف در کشور ما هیچ‌گونه کنترل و نظارتی بر توزیع و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و یا حتی دیگر داروها در دام‌ها وجود ندارد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق که نشان‌گر آلودگی گوشت مرغ مورد آزمایش بوده است، لزوم انجام تحقیق گسترده بر روی مواد غذایی مختلف با منشأ دامی از قبیل گوشت، احشاء خوراکی، فرآورده‌های گوشتی، شیر، لبنیات، عسل و غیره احساس می‌شود و برنامه‌ها باید براساس چهار اصل پیشگیری، پیگیری، نظارت و آزمایشات اکتشافی بنا گردد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مراتب سپاس خود را از همکاری آقایان محمد جواد جهان مرد، دکتر حسن ممتاز، محمدرضا ناظم اعلام می‌دارند.

بررسی ایشان نشان داد که بقایای آنتی‌بیوتیکی در ۵۴/۲ درصد از نمونه‌های عضلات سینه، ۹/۹ درصد نمونه‌های کبد و ۲/۶ درصد نمونه‌های کلیه بیش از حد مجاز است (۱). کبها در سال ۱۳۷۶ با استفاده از همین روش ۲۵۰ لاشه مرغ قابل مصرف کشتار شده در کشتارگاه‌های طیور اطراف شیراز را بررسی نمود که ۱۲/۴ درصد از نمونه‌ها را آلوده به بقایای آنتی‌بیوتیکی (بیش از حد مجاز) اعلام نمود. در همین بررسی ۱۱/۲ درصد از نمونه‌های عضلات سینه، ۸ درصد نمونه‌های کبد و ۶/۸ درصد نمونه‌های کلیه دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی بیش از حد مجاز بودند (۴).

Kessabi و همکاران (۱۹۹۰) در موراگو، ۳۳ درصد از کبد جوجه‌های مورد مطالعه را آلوده به بقایای آنتی‌بیوتیک گزارش نمودند (۱۲).

Bellomonte و همکاران (۱۹۹۳) در ایتالیا با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (H.P.L.C) درصد آلودگی نمونه‌های طیور مورد مطالعه را به بقایای آنتی‌بیوتیکی از ۸۸ درصد تا ۹۵ درصد گزارش نمودند (۹). در مطالعه مشابهی توسط Schwaiger و Hortner (۱۹۹۲) به‌روشنی ۶۰ تا ۷۰ درصد نمونه گوشت‌های طیور مورد مطالعه حاوی مخلوطی از بقایای آنتی‌بیوتیکی بوده است (۱۴).

نتایج و گزارشات متعدد ثبت شده در ایران و برخی از کشورهای دیگر نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک‌ها به طور وسیعی در صنعت طیور استفاده می‌شوند و متأسفانه عدم رعایت دوره دفع دارویی قبل از کشتار، استفاده غیرمجاز دارو به وسیله دامداران، تجویز بیش از حد دز توصیه شده و فقدان روش‌های سریع، دقیق و ارزان قیمت جهت کنترل بقایای آنتی‌بیوتیکی

فهرست منابع

۱. پرونده، ح. (۱۳۷۴): بررسی میزان آلودگی آنتی بیوتیکی لاشه طیور با استفاده از روش F.P.T در کشتارگاه‌های اطراف شیراز، پایان نامه برای دریافت درجه دکترای دامپزشکی از دانشگاه شیراز، صفحات: ۲۶-۱۷، ۵۳-۴۸.
۲. ترکان، س. (۱۳۷۹): بررسی میزان آلودگی آنتی بیوتیکی لاشه طیور با استفاده از روش F.P.T در کشتارگاه‌های اصفهان، پایان نامه برای دریافت درجه دکترای دامپزشکی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، صفحات: ۷۵-۷۰.
۳. حاج هاشمی، و.، ادیب، ع. و قفقازی، ت. (۱۳۸۱): فارماکولوژی پزشکی، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، صفحات: ۴۰۶-۴۰۱.
۴. کهما، ح. (۱۳۷۶): بررسی تأثیرات حرارت جوش بر روی بقایای آنتی بیوتیکی لاشه طیور در کشتارگاه‌های اطراف شیراز با استفاده از روش F.P.T، پایان نامه برای دریافت درجه دکترای دامپزشکی از دانشگاه شیراز.
۵. گلیان، ا. (۱۳۷۴): تغذیه طیور (ترجمه)، تألیف: لیسون، اس. و سامرز، جی. دی.، چاپ اول، تهران، واحد آموزش و پرورش معاونت کشاورزی سازمان اقتصادی کشور، انتشارات کوثر، صفحات: ۷-۵.
۶. فقیهی، س.م. (۱۳۸۳): مبانی فارماکولوژی دامپزشکی، چاپ اول، انتشارات جنگل، صفحات: ۲۹۶-۲۹۲.
۷. مطلبی، ع.ع. (۱۳۸۳): مطالعه و بررسی باقی مانده داروها، سموم و آلاینده‌های محیط زیست در میگوی پرورشی ایران، رساله دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
8. Ansari, F.A. and Khaton, H. (1994): Multiplex antibiotic resistance among gram negative bacteria isolated from poultry. *Indian Journal of Experimental Biology*, 32(3): 211-212.
9. Bellomonte, G., Filesi, C., Macri, A., Mosca, M. and Sanzini, E. (1993): High performance liquid chromatographic determination of nitrofurans and free chloramphenicol in poultry muscle, liver and eggs. *Italian Journal of Food Science*, 5(3): 247-253.
10. Franco, D., Wabb, J. and Taylor, C.E. (1995): Antibiotic and sulphonamide residues in meat: Implication for human health. *Journal of Food Protection*, 53(2): 175-178.
11. Kessabi, M., Abdennebi, E., Laaje, R. and Alhafi, A. (1990): Contamination of eggs poultry, liver and kidney by chloramphenicol in Morocco. *Sciences des Aliments*, 19(1): 203-208.
12. Jafari, M.T., Khayamian, T., Shaer, V. and Zarei, N. (2007): Determination of veterinary drug residues in chicken meat using corona discharge ion mobility spectrometry. *Analytical Chemical Acta*. 581: 147-153.
13. Prscott, J.F. and Baggot, J.D. (1993): *Antimicrobial in veterinary medicine*. 2th ed., Iowa state university press/ Amos, pp: 10-63, 145-225.
14. Schwaiger, I. and Hortner, H. (1992): Thin-layer bioautographic assay for simulataneous detection of polyether antibiotics monensin, salinomycin, narasin and lasolacid in poultry meat. *Wiener Tierarztliche Monatschrift*, 79(12): 365.
15. Smithere, R., Lott, A.F., Dalziel, R.W. and Ostler, D.C. (1980): Antibiotic residues in meat in the United Kingdom. An assessment of specific tests to detect identify antibiotic residues. *Journal of Hygiene*, 85(3): 359-69.

Evaluation of chloramphenicol residues in poultry meat using ELISA method in Isfahan

Rahimi, E.^{1*}, Jafarian, M.²

1-Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahre-kord Branch, Shahre-kord, Iran

2-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahre-kord Branch, Shahre-kord, Iran

**Corresponding author's email: ebrahimrahimi55@yahoo.com*

(Received: 30.10.2008, Accepted: 12.3.2009)

Abstract

Chloramphenicol is classified as a broad spectrum veterinary drugs used to treat pulmonary infections in the poultry industry. Even relatively low levels of chloramphenicol residues may give rise to an irreversible type of bone marrow depression leading eventually to aplastic anemia. This study was conducted with the aim of chicken meat. Chloramphenicol concentration was measured by enzyme (ELISA) in 140 chicken meat samples (thigh muscles) presented to the consumption market of Isfahan city. In 25 of the 140 evaluated samples (17.9%), presence of chloramphenicol residues was detected in concentrations ranging from 14 to 311 ng/kg with a mean \pm standard deviation of 97.9 ± 17.7 ng/kg. The results of chloramphenicol residues were low in the samples but this drug is still being used in the poultry industry and this can be a risk to public health.

Keywords: Antibiotic, chloramphenicol, meat, poultry, ELISA