مطالعه میزان باقی‌مانده انروفلوکساسین در عضلات و کبد ماهیان قزل آلای رنگین کمان در استان چهار محال و بختیاری به روش الایزا

فیروز فدایی فرد

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، شهرکرد، ایران.
نویسنده مسئول مکاتبات: Fadaeifard@gmail.com
(دریافت مقاله: ۹۱/۳/۳ پذیرش نهایی: ۹۱/۸/۲۸)

چکیده

انروفلوکساسین از آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف دامپزشکی است که در سال‌های اخیر استفاده آن در کنترل بیماری‌های عفونی ماهیان پرورشی رشد چشمگیری داشته است. هدف از انجام مطالعه حاضر اندازه‌گیری میزان باقی‌مانده انروفلوکساسین در عضلات و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی استان چهار محال و بختیاری به روش الایزا بود. برای این منظور در فصول بهار و تابستان ۱۳۹۰ به مزارع پرورشی مناطق اردل و کوهرنگ مراجعه و از هر منطقه سه مزرعه انتخاب گردید و ۱۵ نمونه در سه گروه وزنی کمتر از ۵۰ گرم، ۵۰ تا ۱۵۰ گرم و بیشتر از ۱۵۰ گرم (۵ نمونه از هر گروه وزنی) صورت گرفت. طبق نتایج مطالعه، بیشترین و کمترین درصد باقی‌مانده انروفلوکساسین به ترتیب در گروه‌های وزنی زیر ۵۰ گرم و بالای ۱۵۰ گرم و به میزان ۵۸/۳۳ و ۲۳/۳۳ درصد ردیابی شد. در مقایسه بین مناطق مختلف نیز کوهرنگ با میزان۱۱/۵۰ ± ۱۳/۸٤ و ۱۸/۰٦ ± ۱۹/۹۵ و اردل با میزان ۱۱/٦۲ ± ۱۲/۸۳ و ۱۱/۰۹ ± ۱۱/۲۲ میکروگرم در کیلوگرم آنتی‌بیوتیک در عضله و کبد به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان باقی‌مانده بودند. همچنین میزان باقی‌مانده در عضله و کبد در فصل بهار ۱۳/۰۰ ± ۱٤/۲۷ و ۲۱/٦۹ ± ۲۲/۰٦ و در فصل تابستان ۱۰/۲۹ ± ۱۲/٤۰ و ۷/۳۱ ± ۸/۸٦ میکروگرم در کیلوگرم بوده است. در ضمن در تمامی گروه‌های وزنی میزان باقیمانده انروفلوکساسین در نمونه‌های کبد بالاتر از عضلات تشخیص داده شد. اما در کل میزان باقی‌مانده انروفلوکساسین در نمونه‌های آزمایش شده پایین‌تر از حد مجاز اتحادیه اروپا بود.

واژه‌های کلیدی: انروفلوکساسین، الایزا، قزل‌آلای رنگین کمان، چهار محال و بختیاری

مقدمه

افزایش تولیدات منابع دریایی و توسعه آبزی پروری در دنیا باعث افزایش تولید غذاهای فرموله، آنتی بیوتیک‌ها، ضد قارچ‌ها و مواد شیمیایی گیاهی گشته است (FAO, 2008). تحقیقات مختلف نشان داده که صنایع آبزی پروری رایج می‌تواند منجر به افزایش سطوح باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی، باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، آلوده کننده‌های آلی پایدار، فلزات، انگل‌ها و ویروس‌ها در ماهیان و سخت‌پوستان خوراکی پرورشی گردد. گروه‌های ویژه در معرض خطر با این آلوده‌کننده‌ها شامل کارگران مزارع پرورشی، موجودات زنده اطراف این مزارع و مصرف‌کنندگان این تولیدات آبزی پروری هستند (Sapkota et al., 2008). در صنعت آبزی پروری استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های باکتریایی منجر به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌هایی مثل *آئروموناس هایدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*)، *آئروموناس سالمونیسیدا* (*Aeromonas salmonicida*)، *پاستورلا پیسیدا* (*Pasteurella piscicida*)، *ادواردزیلا تارد* (*Edwardsiella tarda*)، *ادواردزیلا ایکتالوری* (*Edwardsiella ictaluri*)، *ویبریو انگوئیلاروم* (*Vibrio anguillarum*)، *ویبریوسالمونیسیدا* (*Vibrio Salmonicida*)، *یرسینیا راکری* (*Yersinia ruckeri*)، *استرپتوکوکوس اینیایی* (*Streptococcus iniae*) و *لاکتوکوکوس گارویه* (*Lactococcus garvieae*) شده است.

و لزوم انجام مطالعات کنترل شده برای تعیین اثر درمان با عوامل ضد میکروبی بر بوم‌شناسی مزارع پرورش ماهی بالاخص در سطح میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (Hernández Serrano, 2005). برخی از محققین بر روی آنالیز باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل آنتی‌باکتریال مواد غذایی حیوانی با تکنیک اسپکترومتری توده‌ای کروماتوگرافی مایع یا Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) و آنالیز این ترکیبات در باقی‌مانده‌های دامپزشکی با تکنیک LC–MS–MS تأکید دارند (Balizs and Hewitt, 2003; Di Corcia and Nazzari, 2002; Horie and Takegami, 2006; Niessen, 1998).

استفاده با دوز پایین آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی طی دوره‌های طولانی مدت ممکن است باعث افزایش سویه‌های مقاوم باکتریایی گردد. به منظور حفظ بهداشت و سلامت انسانی، اتحادیه اروپا حداکثر باقی‌مانده مجاز این داروها و سایر ترکیبات دامپزشکی را مشخص نموده و استفاده از داروهای دامپزشکی بر اساس مقررات اتحادیه اروپا (ثبت EC/۹۰/۲۳۷۷) معرفی شده است (EC, 2008)، که در این مجموعه مقررات میزان حداکثر باقی‌مانده ایمن آنتی‌بیوتیک‌ها برای ماهی نیز تعریف شده است. همچنین کمیسیون غذایی کدکس که توسط سازمان خواربار جهانی(F.A.O) و سازمان بهداشت جهانی (W.H.O) راه‌اندازی شده، سازمان غذا و داروی آمریکا (F.D.A)، سازمان بازرسی مواد غذایی کانادا (The Canadian Food Inspection Agency)، دفتر دامپزشکی و آفت‌کش‌های استرالیا (The Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority) و وزارت بهداشت شیلی (The Health Department from Chile) نیز از سایر مراکزی هستند که محدوده قابل تحمل انواع داروها را با یک سری تفاوت‌هایی میان آنها

اعلام کرده اند. البته در میزان استفاده این داروها و حتی اجازه مصرف کردن یا نکردن آنها بین این سازمان‌ها اختلافاتی نیز وجود دارد به عنوان مثال فقط مقررات اتحادیه اروپا اجازه استفاده از فلوروکینولون‌ها را در ماهیان پرورشی داده است (EC, 2003). بر اساس پیشنهاد اتحادیه اروپا حداکثر میزان انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در بافت‌های ماهی و سایر حیوانات که برای انسان مضر نباشد و به عنوان بیشینه میزان باقی‌مانده (MRL) توصیف می‌گردد ۱۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم گوشت ماهی است (Balizs and Hewitt, 2003).

کینولون‌ها گروهی از آنتی‌بیوتیک‌های ساختگی هستند که در درمان بیماری‌های عفونی در صنعت آبزی پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند که به عنوان آخرین نسل عوامل آنتی‌بیوتیکی معرفی گردیده است.

مکانیسم فعالیت فلورکینولون‌ها بصورت باکتری کشی است و نقش آنها در ممانعت از آنزیم DNA gyrase دیواره سلولی باکتری‌ها که در تکثیر DNA نقش دارند می‌باشد (Dulopnt, 1989). از انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین به دلیل حداقل غلظت‌های ممانعتی نسبتاً پایین برای حساس‌ترین پاتوژن‌های ماهی و انتشار مؤثر آنها در بدن، به صورت خوراکی و به شکل گسترده‌ای در درمان عفونت‌های باکتریایی عمومی ماهیان استفاده می‌شود (O'Grady et al., 1988). استفاده کینولون‌ها در ماهیان و به دنبال آن مصرف آنها در انسان باعث بروز مسمومیت‌های مستقیم یا عامل افزایش مقاومت عوامل بیماری‌زای انسانی و به مخاطره افتادن سلامت انسان می‌گردد. این داروها اثرات سمی بر غضروف‌های مفصلی و بروز بیماری آرترالژیا (Arthropathy) یا آرتروپاتی (Arthralgia) جوانی داشته و باعث ایجاد واکنش‌های افزایش حساسیت آلرژیک می‌گردد (Juan-Garca et al., 2006). انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین دو دارو از دسته کینولون‌ها هستند که از طریق روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و ردیابی از طریق فلورسنس قابل شناسایی هستند (Olutosin and James, 2004). با توجه به مطالعات محدود در زمینه بررسی باقی‌مانده این آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی هدف از انجام مطالعه حاضر ردیابی و اندازه‌گیری میزان باقی‌ماندگی انروفلوکساسین در عضلات و کبد ماهیان قزل آلای رنگین کمان پرورشی استان چهار محال و بختیاری به روش الایزا بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

این تحقیق طی مدت شش ماه (بهار وتابستان۱۳۹۰) در برخی مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری به منظور بررسی وضعیت باقی‌ماندگی آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین صورت پذیرفت. حوزه تحقیق شامل شهرستان‌های کوهرنگ و اردل که از بیشترین تمرکز مزارع پرورش ماهی قزل آلا برخوردار هستند می‌باشد. در هر شهرستان حداقل سه مزرعه (بر اساس میزان تولید) انتخاب و از هر مزرعه در سه گروه وزنی زیر۵۰ گرم،۵۰ تا ۱۵۰ گرم و بالای ۱۵۰ گرم نمونه‌برداری صورت پذیرفت. در هر رده وزنی نیز ۵ عدد ماهی برداشت می‌گردید البته در اندازه‌های زیر ۵۰ گرم تعداد بیشتری ماهی انتخاب می‌شد تا بتوان میزان نمونه عضله و کبد لازم برای

تست را از آنها جدا نمود. مجموعاً در هر فصل ۱۸۰ نمونه و در کل ۳۶۰ نمونه بافتی جهت سنجش میزان آنتی‌بیوتیک جمع‌آوری گردید. در هر مزرعه نیز برخی اطلاعات و تاریخچه وقوع بیماری‌های عفونی، مصرف احتمالی دارو و طول دوره درمان اخذ و ثبت می‌شد. در هر گروه وزنی، ماهیان به طور تصادفی انتخاب و درون کیسه مخصوصی که دارای مشخصات مزرعه‌ای بود قرار داده شده و در کنار یخ به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل می‌گردید. این نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در شرایط انجماد (۱۸- درجه سلسیوس) نگه‌داری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها و انجام تست الایزا

ابتدا ماهیان را از فریزر خارج نموده و پس از چند دقیقه نگه‌داری در شرایط آزمایشگاه اقدام به برش عضله و خارج نمودن کبدهای آنها می‌شد. سپس ۱۰ گرم از نمونه اندامی را جدا نموده و پس از همگن کردن آن، ۰/۵ گرم از نمونه همگن به داخل لوله آزمایش انتقال داده می‌شد و ۱/۵ میلی لیتر از متانول ۸۰ درصد (مخلوط ۸ میلی لیتر متانول ۱۰۰ درصد و ۲ میلی لیتر بافر رقیق‌کننده (SDB) به آن افزوده و به خوبی تکان داده می‌شد. محتویات داخل لوله را به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رو را به داخل یک لوله تمیز وارد و ۹۰۰ میکرولیتر از SDB را به آن اضافه کرده و در نهایت مقدار۵۰ میکرولیتر از آن جهت تست سنجش ایمنی آنزیمی استفاده می‌گردید. به منظور انجام تست الایزا از کیت الایزای انروفلوکساسین شرکت Europroxima(Netherlands) استفاده شد حساسیت این کیت برابر با ۰/۵ قسمت در بیلیون (۰/۵ppb)، میزان متوسط بازیافت آن بین ۷۵ تا ۱۳۰ درصد، میزان واکنش متقاطع برای انروفلوکساسین (۱۰۰ درصد) و سیپروفلوکساسین (۰/۰۰۳ درصد) و محدوده ردیابی آن ۱۰ نانوگرم در هر گرم بافتی است. به منظور اندازه‌گیری میزان باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی ابتدا با آماده‌سازی معرف‌های مربوط به پروتکل و با استفاده از یک میکروپلیت ۹۶ خانه اقدام به انجام آزمایش گردید بطوریکه بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد صفر را (در دو تکرار) در چاهک‌های A_1 و A_2 و۵۰ میکرولیتر(در دو تکرار) در چاهک‌هایB_1 و B_2 ریخته، سپس ۵۰ میکرولیتر از استاندارد انروفلوکساسین را (در دو تکرار) درون چاهک‌های C_1و C_2 تا H_1 و H_2 قرار داده شد. در مرحله بعد ۵۰ میکرولیتر از هر محلول نمونه (در دو تکرار) آماده کرده و به چاهک‌های باقی‌مانده (۸۰ چاهک دیگر) افزوده شد. در ادامه ۲۵ میکرولیتر از کنژوگه (ERFX-HRPO) درون چاهک‌ها به غیر از A_1 وA_2 ریخته شد و میکروپلیت برای چند ثانیه داخل یک شیکر مخصوص قرار داده و تکان داده شد متعاقباً پلیت به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس منتقل شده و سپس با دور ریختن محتوای چاهک‌ها اقدام به سه بار شستشوی آنها با بافر شستشو گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا را وارد چاهک‌ها نموده و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده را به هر چاهک اضافه کرده و بلافاصله با استفاده از دستگاه الایزا خوان میزان جذب نوری آنها در طوج موج ٤٥٠ نانومتر تعیین گردید و مقادیر به دست آمده با نمودار کالیبراسیون مقایسه شده و میزان

باقی‌مانده دارو در واحد میکروگرم در کیلوگرم به دست آمد.

آنالیز آماری

جهت بررسی باقی‌ماندگی مقادیر آنتی‌بیوتیک در بین گروه‌های وزنی مختلف از آنجائیکه یک متغیر در بین ۳ گروه وزنی مورد ارزیابی قرار گرفته است لذا از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و مقایسه بین میانگین داده‌ها از روش دانکن استفاده شد.

برای بررسی وجود تفاوت آماری بین مناطق و فصول مختلف نیز از آزمون T-test مستقل استفاده گردید به طوریکه هدف به دست آوردن تفاوت آماری متغیر در گروه‌های دوتایی بوده است در ضمن برای کلیه آزمون‌ها از نرم افزارSPSS ورژن ۱۷ استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج اندازه‌گیری میزان باقی‌مانده انروفلوکساسین در عضله و کبد ماهیان قزل آلای رنگین کمان پرورشی استان چهارمحال و بختیاری در فصول و مناطق در جدول‌های ۱ تا ۳ آمده است.

جدول ۱: میانگین مقادیر باقی‌ماندگی انروفلوکساسین در کبد و عضله ماهیان در اوزان مختلف

اندام و درصد آلودگی / گروه وزنی	تعداد نمونه‌ها	نمونه‌های آلوده (٪)	عضله (µg/kg)	کبد (µg/kg)
زیر ۵۰ گرم	۱۲۰	۵۸/۳۳	۱۲/۹٤± ۱۰/۷۱ [a]	۱۲/۵۰±۱۱[a]
بین ۵۰ تا ۱۵۰ گرم	۱۲۰	۳۷/۵۰	۱٤/۸۱± ۹/۱۱ [a]	۱۷/۸۳± ۱۷/۸۱ [a]
بالای ۱۵۰ گرم	۱۲۰	۲۳/۳۳	۱۲/۰۷± ۹ [a]	۱۷/٦۰± ۱٤/۸۳ [a]

a: تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس معنی‌دار نیست

در جدول ۱ مقایسه میانگین باقی‌ماندگی انروفلوکساسین در کبد و عضله ماهیان در سه گروه وزنی زیر ۵۰ گرم، بین ۵۰ تا ۱۵۰ گرم و بالای ۱۵۰ گرم صورت گرفته است. نتایج نشان دهنده این است که تفاوت معنی‌داری بین میزان آنتی‌بیوتیک در گروه‌های مختلف و به تفکیک در کبد و عضله ماهیان وجود ندارد.

جدول ۲: میزان میانگین باقی‌مانده انروفلوکساسین در عضله و کبد ماهیان در مناطق مختلف

اندام و درصد آلودگی / منطقه	تعداد نمونه‌ها	نمونه‌های آلوده (٪)	عضله (µg/kg)	P value	کبد (µg/kg)	P value
اردل	۱۸۰	۵۲/۷۷	۱۲/۸۳± ۱۱/٦۲		۱۱/۲۲± ۱۱/۰۹	
کوهرنگ	۱۸۰	۷۲/۲۲	۱۳/۸٤± ۱۱/۵۰	۰/٦۹*	۱۹/۹۵± ۱۸/۰٦	۰/۱۷۱*

* تفاوت مقادیر باقی‌ماندگی بین دو منطقه معنی‌دار نیست.

در جدول ۲ نتایج مقایسه میانگین باقی‌ماندگی انروفلوکساسین در عضله و کبد ماهیان در دو منطقه اردل و کوهرنگ آمده است. با توجه به داده‌ها تفاوت آماری معنی‌داری بین میزان آنتی‌بیوتیک در دو منطقه مورد بررسی مشاهده نمی‌شود (p>۰/۰۵).

جدول ۳: میزان میانگین باقی‌مانده انروفلوکساسین در عضله و کبد ماهیان در فصول مختلف

اندام و درصد آلودگی / فصل	تعداد نمونه‌ها	نمونه‌های آلوده (٪)	عضله (µg/kg)	P value	کبد (µg/kg)	P value
بهار	۱۸۰	٦٣/٨٨	١٤/٢٧± ١٣/٠٠		٢٢/٠٦± ٢١/٦٩	
تابستان	۱۸۰	٤٥/٥٥	١٢/٤٠± ١٠/٢٩	٠/٤٧٨*	٨/٨٦± ٧/٣١	٠/٠١٥**

* تفاوت مقادیر باقی‌ماندگی بین دو فصل با استفاده از آزمون t مستقل معنی‌دار نیست.

** تفاوت مقادیر باقی‌ماندگی بین دو فصل معنی‌دار است (p< ۰/۰۵).

در جدول ۳ نتایج مقایسه میانگین باقی‌ماندگی انروفلوکساسین در عضله و کبد ماهیان در دو فصل بهار و تابستان آمده است با توجه به داده‌های به دست آمده تفاوت آماری معنی‌داری بین میزان آنتی‌بیوتیک در عضله ماهیان در دو فصل بهار و تابستان مشاهده نمی‌شود. ولی در کبد ماهیان بین مقادیر آنتی‌بیوتیک در فصول مورد بررسی اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده می‌گردد.

بحث و نتیجه‌گیری

از آنجائیکه استان چهار محال و بختیاری از مناطق پر تولید ماهی قزل آلای رنگین کمان کشور بوده و در سال‌های اخیر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها رشد چشمگیری داشته است، لذا مطالعه حاضر با هدف ردیابی و اندازه‌گیری باقی‌مانده‌های انروفلوکساسین در کبد این ماهیان در سه گروه وزنی زیر ۵۰ گرم، ۵۰ تا ۱۵۰ گرم و بالای ۱۵۰ گرم در دو منطقه اردل و کوهرنگ و در دو فصل بهار و تابستان ۱۳۹۰ انجام گرفت. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، میزان باقی‌ماندگی انروفلوکساسین در کبد و عضله ماهیان مورد مطالعه در سه گروه وزنی زیر ۵۰ گرم، ۵۰ تا ۱۵۰ گرم و بالای ۱۵۰ گرم اختلاف آماری معنی‌داری نداشته و در مقایسه بین اندام‌های مختلف در تمام گروه‌های وزنی میزان انروفلوکساسین در کبد بیشتر از عضله بوده است که دلیل آن نیز به خاطر تجمع و تمرکز بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها در کبد (به منظور متابولیسم) است؛ همچنین در مقایسه بین میزان دارو در کبد گروه‌های مختلف وزنی به ترتیب زیر ۵۰ گرم و بالای ۱۵۰ گرم از کمترین و بیشترین میزان تجمع برخوردار بوده‌اند که می‌توان دلیل آن را مصرف بیشتر آنتی‌بیوتیک در اوزان بالاتر ماهیان دانست. در مقایسه بین گروه‌های وزنی در معرض آنتی‌بیوتیک نیز بالاترین میزان مصرف در گروه زیر ۵۰ گرم با ۵۸/۳۳ درصد و کمترین میزان در گروه بالای ۱۵۰ گرم با ۲۳/۳۳ درصد دیده می‌شود این آمار نشان از بالا بودن مصرف دارو در ماهیان زیر ۵۰ گرم دارد که علت آن را می‌توان استفاده جهت کنترل تلفات مشکوک به بیماری‌های عفونی در این رده وزنی دانست.

با توجه به نتایج بدست آمده در جدول ۲ تفاوت آماری معنی‌داری بین میزان باقی‌ماندگی انروفلوکساسین در عضله و کبد ماهیان در دو منطقه اردل و کوهرنگ مشاهده نمی‌شود اما در مقایسه بین میانگین داده‌ها میزان باقی‌ماندگی آنتی‌بیوتیک در عضله و کبد ماهیان منطقه کوهرنگ بیش از منطقه اردل بوده است که به احتمال به مصرف بالاتر آنتی‌بیوتیک در منطقه کوهرنگ مرتبط می‌باشد. بطوریکه مزارع منطقه کوهرنگ با میزان ۱۱/۵۰ ±۱۳/۸٤ و ۱۸/۰٦ ± ۱۹/۹۵ و اردل با میزان ۱۱/٦۲ ± ۱۲/۸۳ و ۱۱/۰۹± ۱۱/۲۲ میکروگرم در کیلوگرم آنتی‌بیوتیک در عضله و کبد به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان باقی‌مانده بوده‌اند. اطلاعات پرسش‌نامه‌ای اخذ شده از مزارع نیز گواه بر این ادعا است؛ بطوریکه مزارع واقع در منطقه کوهرنگ از میزان مصرف بالاتری از آنتی‌بیوتیک برخوردار بوده‌اند.

همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود مقایسه بین میزان باقی‌ماندگی انروفلوکساسین در عضله و کبد ماهیان در فصول مختلف نشان از تفاوت معنی‌دار میانگین داده‌ها در کبد ماهیان و عدم تفاوت معنی‌دار بین داده‌ها در عضله ماهیان در دو فصل بهار و تابستان دارد. اما وضعیت قابل مشهود در این مقایسه بالا بودن میزان باقی‌ماندگی به ترتیب در عضله و کبد ماهیان در فصل بهار با میزان ۱۳/۰۰ ± ۱٤/۲۷ و ۲۱/٦۹ ± ۲۲/۰٦ و در فصل تابستان ۱۰/۲۹ ±۱۲/٤۰ و ۷/۳۱ ± ۸/۸٦ میکروگرم در کیلوگرم بوده است که بهترین توجیه برای این اتفاق افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک در بچه ماهیان (که عموماً در فصل بهار رخ می‌دهد) و بالا رفتن دما در فصل تابستان و تسریع در متابولیزه شدن دارو و دفع از بدن دانست. براساس اخذ اطلاعات واصله از مزارع مورد بررسی در مطالعه حاضر برخی از این مزارع در طول دوره پرورشی خود تجربه مصرف انروفلوکساسین را داشته ولی بسته به وزن ماهی، فصل مورد بررسی و همچنین در منطقه مورد مطالعه تفاوت‌هایی را می‌توان مشاهده نمود که به بحث هرکدام از آنها پرداخته شد ولی مسأله مهم حضور این آنتی‌بیوتیک در اندام‌های ماهی قزل آلا به عنوان پرمصرف‌ترین ماهی پرورشی کشورمان است که بایستی از نقطه نظر بهداشتی مورد توجه قرار گیرد. البته مقدار باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی در تمام گروه‌های وزنی مورد مطالعه و در مناطق و فصول مختلف پائین‌تر از حد مجاز اعلام شده توسط اتحادیه اروپا (بیش از ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم) بوده است. در مقایسه با سایر دام‌ها مطالعات گسترده‌ای در زمینه ردیابی باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در ماهی با استفاده از روش‌های مختلف صورت نگرفته است ولی از جمله تحقیقات به عمل آمده در این خصوص می‌توان به در ردیابی باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی ماهیان (Samanidou et al., 2007)، آنالیز باقی‌مانده‌های دارویی دامپزشکی در ماهی با استفاده از تکنیک Tandem Mass Spectrometry Detection (LC/MS/MS) (Tittlemier et al., 2007)، تعیین باقی‌مانده‌های کینولون‌ها در ماهی با شیوه Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry توسط (Yolanda Pico, 2006)، تعیین همزمان آنتی‌بادی‌های فلوروکینولون درفرآورده‌های دریایی از طریق الایزا (Huet et al., 2006)، تعیین باقی‌ماندگی اریترومایسین در ماهی قزل آلا با روش TMS (Lucchetti et al., 2005)، تعیین باقی‌مانده کلرامفنیکل در ماهی و میگو از طریق کروماتوگرافی گازی با دتکتور Microcell Electron Capture (Ding

et al., 2005) و تعیین چند دارو در ماهی و میگوهای خوراکی با استفاده از تکنیک HPLC (Ueno et al., 1999) اشاره نمود.

طی اندازه‌گیری سه آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسیکلین، انروفلوکساسین و اریترومایسین در بافت عضله ماهی قزل آلای رنگین استان چهارمحال و بختیاری به روش HPLC میزان باقی‌ماندگی انروفلوکساسین ۰/۰۵ تا ۰/۷۳ میکروگرم در هر گرم به دست آمد که نتایج آن مشابه نتایج تحقیق حاضر است (Soltani, 2010). در ارتباط با فرآیند کاهش میزان آنتی‌بیوتیک در دام‌ها و دوره پرهیز از مصرف آنها تحقیقات زیادی صورت گرفته و زمان لازم جهت دفع دارو و متابولیت‌های آن اعلام شده است ولی از آنجائیکه آبزیان موجوداتی خونسرد بوده و واکنش‌های فیزیولوژیک بدن آنها متأثر از محیط است این امر تا حدود زیادی وابسته به دمای محیط است بطوریکه حداقل دوره پرهیز از مصرف دارو که توسط آیین‌نامه شماره ۸۲/۲۰۰۱ اتحادیه اروپا برای برخی انواع فرآورده‌های دریایی پیشنهاد شده است ۵۰۰ درجه روز است ولی در مطالعه دیگری زمان طولانی‌تر یعنی ۸۱٦ درجه روز را برای جمع میزان انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در بافت‌های عضلات و پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان پیشنهاد نموده‌اند. بطوریکه با خوراندن مقدار ۱۰ میلی گرم در کیلو گرم انروفلوکساسین به قزل آلای رنگین کمان در هرروز روند نزولی هر دو دارو را در نمونه‌های بافتی عضلات، پوست و استخوان مورد بررسی قرار داده و با استفاده ازتکنیک HPLC (با ردیابی فلورسنس) در زمان‌های مختلف بعد از انتهای دوره درمان میزان کاهش دارو را اندازه‌گیری نمودند (Lucchetti et al., 2004). تولیدکنندگان ماهی ملزم به رعایت سطوح میزان مصرفی آنتی‌بیوتیک‌ها و مقررات مربوط به زمان‌های پرهیز از مصرف برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج در آبزی پروری هستند. از آنجائیکه واکنش‌های فیزیولوژیک ماهیان تابع تغییرات دمای محیط است لذا میزان جذب و دفع داروهای تجویز شده نیز به موازات افزایش دمای آب تسریع می‌یابد از این رو می‌توان انتظار داشت در مناطق گرمتر متابولیسم داروها با سرعت بیشتری انجام شود (Bjorklund and Bylund, 1990). به عنوان مثال ماهی تیلاپیای نیل که یکی از ماهیان مناطق گرمسیری است و دمای مناسب برای زیست آن بین ۲٤ تا ۳۲ درجه است. با توجه به استفاده از آبهای جریان‌دار در پرورش آن، میزان حذف دارو در این گونه ماهی خیلی سریع‌تر از شرایط آزمایشگاهی است (Julie et al., 2002).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در امر کنترل و درمان بیماری‌های باکتریایی به عنوان بخشی از برنامه تولیدی مدیران مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شود و شاید بتوان گفت که اولین سیاست برخوردی آبزی پروران با تلفات مشکوک به بیماری‌های باکتریایی استفاده از این گونه ترکیبات است ولی نوع دارو، طرز استفاده، میزان و دوره مصرف و رعایت زمان پرهیز از مصرف از جمله مقرراتی است که بایستی هر مزرعه‌دار نسبت به رعایت آن اهتمام لازم را به عمل آورد. ماهیان موجوداتی خونسرد بوده و تمام فعالیت‌های فیزیولوژیک بدن آنها متأثر از دمای محیط است لذا در مصرف دارو نیز بایستی به این موضوع توجه خاص داشت. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر میزان باقی‌ماندگی انروفلوکساسین به عنوان یکی از آنتی‌بیوتیک‌های

پرمصرف در آبزی پروری در کبد و عضله ماهی قزل آلای رنگین کمان در گروه‌های مختلف وزنی و در فصول و مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری پائین‌تر از حد مجاز پیشنهادی اتحادیه اروپا بوده و این ماهیان برای مصرف بایستی حداقل ۵۰۰ الی ۸۱٦ درجه روز دوره پرهیز از مصرف را بگذرانند تا سلامتی مصرف‌کنندگان بعدی در معرض خطر نیفتد بطوریکه اگر دمای متوسط آبهای این مزارع ۱۰ درجه سلسیوس باشد دوره اجتناب از مصرف دارو بین ۵۰ الی ۸۱ روز است. یکی دیگر از شواهد بدست آمده مطالعه حاضر مصرف آنتی‌بیوتیک در اکثر گروه‌های وزنی است که این موضوع بایستی از نظر مقررات دامپزشکی مورد بررسی قرار گرفته و نظارت هر بیشتر دستگاه‌های مسؤل را می‌طلبد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله وظیفه خود می‌دانند از کلیه افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری نموده‌اند بالاخص حوزه معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تشکر نمایند.

منابع

- Balizs, G. and Hewitt, A. (2003). Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 492: 105-131.
- Bjorklund, H.V. and Bylund, G. (1990). Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (Salmo gairdneri R). Aquaculture, 84(3-4): 363-372.
- Commission of the European Communities (2003). Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 Amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin.
- Di Corcia, A. and Nazzari, M. (2002). Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. Journal of Chromatography A, 974(1-2): 53-89.
- Ding, S., Shen, J., Zhang, S., Jiang, H. and Sun, Z. (2005). Determination of chloramphenicol residue in fish and shrimp tissues by gas chromatography with a microcell electron capture detector. The Journal of AOAC International, 88(1): 57-60.
- Dulopnt, H.L. (1989). Quinolone antibacterial agents in the management of bacterial enteric infections. In: Wolfson, J.S., Hooper, D.C. (Editors), Quinolone Antibacterial Agents. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 5-34.
- European Commission (2008). Council Regulation 2377/90/EC, Off. J.Eur.Union, L224- www.emea.eu.int
- FAO (2008). State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
- Hernández Serrano, P. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO, Rome.
- Horie, M. and Takegami, H. (2006). Legal restriction on veterinary drug residues and analysis of residual veterinary drug in food by LC/MS (Japanese, English Abstract). Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan, 54: 91-96.
- Huet, A., Charlier, C., Tittlemier, S.A., Singh, G., Benrejeb, S. and Delahaut, P. (2006). Simultaneous determination of (Xuoro) quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 54: 2822-2827.

- Juan-Garca, A., Font, G. and Pic, Y. (2006). Electrophoresis, 27: 2240-2249.
- Julie, B.W., Graham, B., Mary, C.C., Bebak-Williams, J., Bullock, G. and Carson, M.C. (2002). Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system. Aquaculture, 205(3-4): 221-230.
- Lucchetti, D., Fabrizi, L., Guandalini, E., Podestà, E., Marvasi, L., Zaghini, A. and Coni, E. (2004). Long Depletion Time of Enrofloxacin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(10): 3912-3917.
- Lucchetti, D., Fabrizi, L., Esposito, A., Guandalini, E., Pasquale, M. and Coni, E. (2005). Simple confirmatory method for the determination of erythromycin residues in trout: a fast liquid-liquid extraction followed by liquid chromatography-tandem mass. Spectrometry. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53: 9689-9694.
- Niessen, W.M.A. (1998). Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry (Review). Journal of Chromatography A, 812: 53-76.
- O'Grady, P., Moloney, M. and Smith, P.R. (1988). Bath administration of the quinolone antibiotic flumequine to brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmon salar*). Disease of Aquatic Organisms, 4: 27-33.
- Olutosin, R.I. and James, O.P. (2004). Simple rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analalysis, 35: 43-153.
- Samanidou, V., Evaggelia, F. and Evaggelopoulou, N. (2007). Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. Journal of Separation Science, 30: 2549-2569.
- Sapkota, A., Sapkota, A.R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P. and Lawrence, R. (2008). Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. Environment International, 34(8): 1215-1226.
- Soltani, M. (2010). Study of the residuals of some antibiotics in farmed rainbow trout in Chaharmahal va Bakhtiary province, project, No: 2439. Fishery organization of Chaharmahal va Bakhtiary province.
- Tittlemier, S.A., Van De Riet, I.J., Burns, G., Potter, R., Murphy, C., Rourke, W., Pearce, H.M. and Dufresne, G. (2007). Analysis of veterinary drug residues in fish and shrimp composites collected during the Canadian Total Diet Study, 1993-2004. Food Additives and Contaminants, 24(1): 14-20.
- Ueno, R., Sangrungruang, K. and Miyakawa, M. (1999). A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. Food Research International, 32(9): 629-633.
- Yolanda Pico, A.G.F. (2006). Determination of quinolone residues in chicken and fish by capillary electrophoresis mass spectrometry. Electrophoresis, 27: 2240-2249.

Determination of enrofloxacin residue in the muscle and liver of cultured rainbow trout in Chaharmahal-va-Bakhtiary province by ELISA

Fadaeifard, F.

Assistant Professor of Aquatic animal Health and disease Departement, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrkord, Iran.
*Corresponding author email: Fadaeifard@gmail.com
(Received: 2012/5/23 Accepted:2012/11/18)

Abstract

Enrofloxacin is one of the broad-spectrum antibiotics in veterinary medicine which in recent years its application has grown considerably for the control of infectious diseases in farmed fish. The aim of this study was to quantify enrofloxacin residue in muscle and liver of rainbow trout cultured in Chaharmahal-va-Bakhtiary province using ELISA method. For this, the samples were obtained from the farms located in Ardal and Koohrang areas during the spring and summer of 2011. Three farms were chosen from each area and 15 samples were taken from three weight categories including < 50, 50-150 and > 150 g (5 samples from each category). Results revealed that maximum (58.33) and minimum (23.33) percentage of enrofloxacin residue was determined in <50 g and >150 g categories, respectively. In Koohrang region, the quantity of enrofloxacin residues in muscle and liver samples was 13.84 ± 11.50 and 19.95 ± 18.06, respectively. Meanwhile in Ardal, the quantity of the residue was estimated at 12.83 ± 11.62 and 11.22 ± 11.09, respectively. Considering the sampling time, among spring samples the quantity of the residues in muscle and liver was estimated at 14.27 ± 13 and 22.06 ± 21.69, respectively. The quantity of enrofloxacin among the summer samples was 12.40 ± 10.29 and 8.86 ± 7.31, respectively. Moreover, mean value of enrofloxacin residue in the muscle and liver of Koohrang was higher than Ardal region. It was concluded that enrofloxacin residue was lower than the maximum acceptance limit determined by the European Union.

Key words: Enrofloxacin, ELISA, Rainbow trout, Chaharmahal-va-Bakhtiary