ردیابی و ارزیابی باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین در نمونه کبد، کلیه و گوشت گاو عرضه شده در میادین شهر تهران به روش کیت الایزا و کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا

میترا جلالی[۱]، مریم عطایی[۲]، بهروز اکبری آدرگانی[۳*]

۱- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۲- دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بهداشت مواد غذایی
۳- مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۴)

چکیده

بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها در گوشت و مواد غذایی دیگر با منشأ حیوانی اثرات نامطلوبی روی سلامت مصرف‌کننده دارد. در این پژوهش، ابتدا میزان بقایای آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین در ۴۵ نمونه (۱۵ نمونه گوشت، ۱۵ نمونه کبد و ۱۵ نمونه کلیه) به روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس این نتایج از ۴۵ نمونه، ۴۳ نمونه آلوده به آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شدند. بالاترین سطح آنتی‌بیوتیک هم در نمونه‌های کبد مشاهده شد اما بین نمونه‌های کبد و کلیه تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد (p=۰/۸۹۵). در ادامه، برای تعیین نوع و کمیت این آنتی‌بیوتیک‌ها از بین نمونه‌های آلوده، نمونه‌های با سطح آلودگی یکسان حذف شدند و بقیه نمونه‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) از نظر میزان پنی‌سیلین G، آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین مورد آنالیز قرار گرفتند. براساس نتایج این بررسی، میزان پنی‌سیلین G بالاترین مقدار را در بین انواع پنی‌سیلین داشت و پس از آن به ترتیب آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. همه انواع پنی‌سیلین در نمونه‌های کبد بالاتر از نمونه‌های گوشت و کلیه بود، اما تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار نبود. همچنین، در همه نمونه‌ها همبستگی بالایی بین نتایج الایزا و HPLC وجود داشت و ضریب همبستگی (r^2) در همه گروه‌های مورد مطالعه اعم از نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه بالای ۹۹٪ بود. علاوه بر این مشخص شد در برخی نمونه‌ها، باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک از بیشینه حد مجاز (MRL) استانداردهای جهانی فراتر بود. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، تنظیم و تدوین ضوابط و استانداردهای ملی مرتبط جهت کاهش میزان بقایای آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی با منشأ حیوانی ضروری به نظر می‌رسد.

کلید واژگان: گوشت، کبد، کلیه، پنی‌سیلین، بقایای آنتی‌بیوتیک، الایزا، HPLC

*مسئول مکاتبات: analystchemist@yahoo.com

۱- مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها داروهائی با منشاء طبیعی، نیمه‌سنتزی یا سنتزی می‌باشند و به طور وسیعی برای درمان بیماری‌های باکتریائی در انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند. اهمیت این داروها به ویژه در پرورش حیوانات بسیار بالا است چرا که زمانی که به جیره حیوان افزوده می‌شوند، رشد را به طور قابل ملاحظه‌ای بهبود می‌بخشند. با این وجود، اتحادیه اروپا این فعالیت را از سال ۲۰۰۶ به بعد ممنوع کرده است. بسیاری از خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی در دامپزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند که از آن جمله می‌توان به بتا-لاکتام‌ها (پنی‌سیلین[1] و سفالوسپورین[2])، تتراسایکلین[3]، کلرامفنیکل[4]، ماکرولیدها[5]، اسپکتینومایسین[6]، لینکوسامیدز[7]، سولفون آمید[8]، نیتروایمیدازول[9]، تریمتوپریم[10]، پلی‌مخلوطین[11]، کوئینولون[12] و ماکروسیکلیک‌ها[13] (آنزامیسین[14]، گلیکوپپتید و آمینوگلیکوزید) اشاره نمود [۱]. بقایای داروهای دامپزشکی یا متابولیت‌های آن‌ها در گوشت و مواد غذایی دیگر با منشأ حیوانی اثرات سمی روی سلامت مصرف‌کننده دارد. اضافه کردن آنتی‌بیوتیک‌ها به شکل مکمل به غذای حیوانات به عنوان یک خطر در بهداشت عمومی مطرح می‌باشد. نگرانی عمده روی باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در فرآورده‌های دامی نیست، بلکه مشکل عمده به وجود آمدن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم پاسخ به دزهای آنتی‌بیوتیکی است. زمانی‌که، یک فرد آنتی‌بیوتیک را به مقدارکم و در طولانی مدت از طریق مواد غذائی مصرف می‌نماید، باعث ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماریزا یا غیربیماریزای بدن خود می‌گردد. همچنین، در افرادی که نسبت به مقادیر کم آنتی‌بیوتیک حساسیت بیشتری دارند، با مصرف مواد غذائی حاوی آنتی‌بیوتیک، میزان حساسیت احتمالی افزایش می‌یابد. استفاده گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ظهور گونه‌های مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی شده و این مقاومت ممکن است به انسان نیز منتقل گردد. انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به انسان از طریق زنجیره غذایی صورت می‌گیرد که طی آن ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از فلور میکروبی دام به پاتوژن‌های انسانی منتقل می‌شوند [۲].

از طرفی، مصرف مقادیری ناچیز از باقی‌مانده‌های مواد ضد میکروبی، میکروفلور طبیعی روده انسان که بخش اساسی از فیزیولوژی انسان است، را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این فلور به عنوان مانعی برای ایجاد کلونی توسط باکتری‌های پاتوژن در دستگاه گوارشی عمل می‌کند و نقش مهمی در هضم غذا دارد [۳]. اثرات بهداشتی دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها شامل انواع واکنش‌های آلرژیک به ویژه در افراد حساس به آنتی‌بیوتیک، پایین آوردن میزان آلودگی میکروبی در دام‌ها و ممانعت از تشخیص آزمایشگاهی میکروارگانیسم‌های بیماریزا، اثرات سرطانزایی، جهش زایی در انسان، اختلالات جدار روده و جلوگیری از سنتز بر خی ویتامین‌ها می‌باشد [٤].

جهت حفظ سلامتی انسان در برابر این باقی‌مانده‌ها باید زمان حذف آنها مد نظر قرار گیرد. این زمان عبارت است از بازه زمانی بین زمان تجویز دارو به حیوان تا زمان کشتار به طوری که بتوان اطمینان حاصل کرد میزان باقی‌مانده‌ها به زیر حد مجاز رسیده است. از طرفی، مشخص شده فاکتورهای متعددی میزان این باقی‌مانده‌ها را پس از کشتار نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگرچه بسیاری از تحقیقات بر روش‌های پیشگیری و نیز تشخیص باقی‌مانده‌ها تمرکز یافته‌اند، برخی محققین نیز میزان تغییرات این باقی‌مانده‌ها را در بافت‌های حیوانی طی نگهداری و پخت مورد بررسی قرار داده‌اند. بسیاری از غذاهای حیوانی پیش از مصرف پخته شده یا روش‌های فرآوری دیگری، نظیر استفاده از افزودنی‌ها جهت افزایش قابلیت هضم، بهبود ویژگی‌های حسی، اشتها بر انگیز شدن و افزایش مدت زمان ماندگاری بر آن‌ها اعمال می‌گردد. بنابراین لازم است

1 .Penicilin
2. Tetracycline
3. Cephalosporin
4. Chloramphenicol
5. Macrolide
6. Spectinomycin
7. Lincosamides
8. Sulfonamide
9. Nitroimidazole
10. Trimethoprim
11. Plymechlotin
12. Quinolone
13. Macrocyclic
14. Ansamycin

مطالعات جامعی در این زمینه انجام شود چرا که بیشتر داروهای دامپزشکی از حساسیت بالائی در برابر گرما برخوردارند. به طور کلی می‌توان گفت، فرآیند پخت نمی‌تواند به طور کامل سبب شکسته شدن باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف موجود در مواد غذایی حیوانی گردد اما این فرآیندها می‌توانند سبب کاهش میزان این باقی‌مانده‌ها شوند. بیشتر این باقی‌مانده‌ها در حین جوشیدن از بافت ماده غذایی وارد محیط آبی اطراف شده و بنابراین توصیه می‌شود، این آب دور ریخته شود. در عین حال برخی از این داروها نیز به حرارت مقاوم می‌باشند و می‌توانند در محاسبات میزان دریافتی روزانه توسط مصرف‌کنندگان مد نظر قرار گیرند. یکی دیگر از جنبه‌های مد نظر، بررسی سمیت متابولیت‌های حاصل از تجزیه این باقی‌مانده‌ها در حین فرآیند حرارتی است، چرا که ممکن است بر بدن انسان اثرات سوئی به دنبال داشته باشند [۵]. میزان بقایای ٤ آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین، کلرامفنیکل، انتروفلوکساسین و پنی‌سیلین در گوشت مرغ و گوساله مورد استفاده در مراکز ارتشی تهران با روش HPLC بررسی شد. نتایج نشان داد درصد آلودگی و سطح انتروفلوکساسین در نمونه‌های طیور به ترتیب در تابستان و زمستان ۸۸ و ۱۰۰ درصد بود. برای کلرامفنیکل نیز آلودگی نمونه‌های مورد بررسی در هر دو فصل ۱۰۰ درصد بود. در نمونه‌های گوشت میزان آلودگی به پنی‌سیلین در فصل تابستان و زمستان به ترتیب ۷٦ و ۹۲ درصد بود. در مورد اکسی‌تتراسایکلین نیز میزان آلودگی در تابستان و زمستان به ترتیب ۱۰۰ و ۷۲ درصد بود. به طور کلی نتایج نشان دهنده آن است که در ۹۹ درصد از نمونه‌ها آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشته و جز کلرامفنیکل، هیچ کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها در سطوح بالاتر از MRL نبودند [٦]. مسگری عباسی و همکاران (۱۳۸٦)، از روش HPLC برای اندازه‌گیری باقی‌مانده سه آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین، تتراسایکلین و کلروتتراسایکلین در ۵۰۰ نمونه مختلف گوشت، کبد و کلیه جمع‌آوری شده از کشتارگاه‌های تبریز استفاده کردند. در مجموع، مقدار باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در ۵ درصد از نمونه‌های کلیه و کبد و ۲۱/۷ درصد از کل نمونه‌های مورد بررسی بیشتر از حد مجاز مورد تأئید سازمان بهداشت جهانی بود. برخی پژوهش ها در زمینه باقی مانده آنتی بیوتیک در جدول ۱ نشان داده شده است.

Table 1 Previous Reports about Residual Antibiotics in Some Foodstuffs

Variety of antibiotic	Food sample (No.)	Method	Result	Reference
Enrofloxacin	Liver, meat and kidney of poultry (270)	HPLC	44.27% of samples > MRL	[7]
Chloramphenicol	Meat of poultry (140)	ELISA	25 samples contain 14-311 ng	[8]
Total antibiotic	Milk (50)	Kopen test	Determined in 5 samples	[9]
Oxytetracycline & Tetracycline	Milk (15)	HPLC	80% of samples were rejected	[10]
penicillin G	Milk (992)	Beta star and plate	236 samples were rejected	[11]
Macrolide	Egg (200)	MHA (Mueller Hinton Agar)	12% of samples were rejected	[12]
Total antibiotic	Meat of goat, Cow, pig and egg (634)	Inhibited microbial Culture	21.1 % of samples were rejected	[13]
Sulfamide	Meat (157)	HPLC-FLD	Determined in 9 samples	[14]
20 antibiotics	Meat of poultry and domestic animals, and in milk (125)	HPLC/MS	Detected 15 antibiotics in all of samples	[15]

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه و جمع‌آوری نمونه‌ها

۴۵ نمونه متشکل از ۱۵ نمونه گوشت، ۱۵ نمونه کبد و ۱۵ نمونه کلیه گاو از میادین تره بار مختلف در سطح شهر تهران به طور تصادفی طی یک دوره زمانی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در شرایط مناسب با استفاده از یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در شرایط انجماد (۱۸°C-) نگهداری شدند. کلیه آزمون‌ها بر روی این نمونه‌ها به صورت دو بار تکرار انجام شد.

۲-۲- آماده سازی نمونه‌ها و اندازه گیری باقیمانده با روش الایزا

برای این منظور از کیت‌های الایزا ۹۶ خانه مخصوص انواع پنی‌سیلین (EuroProxima, Netherlands) استفاده شد. در این روش، آنتی‌بادی، ترکیب آمپی‌سیلین- پراکسیداز ترب کوهی (HRP-) و محلول استاندارد یا نمونه به چاهک‌ها اضافه می‌شود. پنی‌سیلین آزاد استاندارد یا نمونه‌ها و کونژوگه آمپی‌سیلین- HRP برای اتصال به جایگاه ویژه آنزیم رقابت می‌کنند (الایزای رقابتی). قبل از شروع تست، نیاز به آماده‌سازی نمونه، بافر رقیق‌کننده، محلول‌های استاندارد، اتصال دهنده (کونژوگه)، بافر شستشو، آنتی‌بادی و محلول رنگی (کروموژن) طبق بروشور کیت‌های مورد استفاده است [۱۴].

طبق دستورالعمل شرکت سازنده، ابتدا ۱ گرم از نمونه‌ها در داخل لوله یکنواخت و سپس با ٤ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه ورتکس شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با دورg ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید و مایع روئی (سوپرناتانت) جدا شد. ۵۰ میکرولیتر از مایع روئی به ۳۵۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده اضافه شد. در نهایت، ۵۰ میکرولیتر از این مخلوط برای تست در میکروپلیت‌های الایزا استفاده شد.

۲-۳- تهیه منحنی استاندارد

برای تعیین غلظت آنتی‌بیوتیک، ابتدا تفاضل OD همه چاهک‌ها از OD مربوط به میانگین چاهک‌های H_1 و H_2 به دست آمد. پس از به دست آوردن B_{max} غلظت‌های مختلف استاندارد، نمودار استاندارد بر مبانی لگاریتم غلظت (محور X) و B_{max} (محور Y) رسم شد. از روی معادله به دست آمده و B_{max} نمونه‌ها، جذب آن‌ها تعیین شد.

B_{max}= (درصد)

OD نمونه یا استاندارد / OD B_{max} استاندارد صفر یا ×۱۰۰

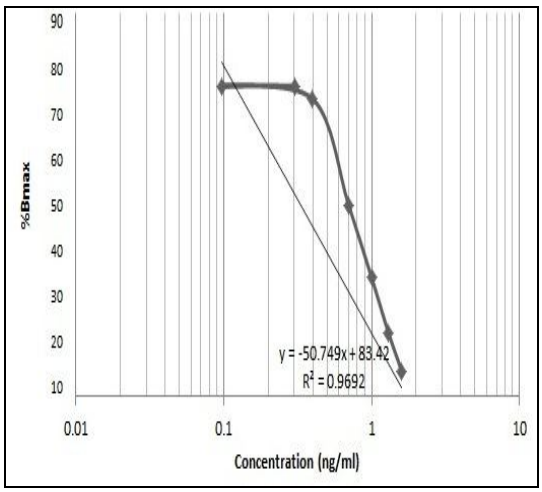

Diagram 1 Standard curve for penicillin compounds in ELISA Test

۲-٤- اندازه گیری غلظت آنتی بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین با استفاده از HPLC

۲-٤-۱- استخراج نمونه

جهت تعیین سطح دقیق آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه که در روش الایزا حضور آنتی‌بیوتیک در آنها به اثبات رسیده بود، از روش HPLC استفاده شد. به طور خلاصه، ۱۰ گرم از بافت‌های محتوی آنتی‌بیوتیک، توزین، به قطعات کوچک تقسیم و در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) با pH معادل ۷/۲ به آن افزوده شد. هموژن کردن با استفاده از هموژنایزر (مدل IKA VORTEX 3 آلمان) انجام گردید. سپس، مجدداً ۲۰ میلی‌لیتر از بافر PBS افزوده شده و نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه هم زده شدند و در نهایت به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسوند (مدل Fritsch-

55743 آلمان) جهت تکمیل فرایند استخراج قرار گرفتند. در ادامه، تیوپ‌ها در g ۱۴۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و سوپرناتانت به لوله‌های جدیدی منتقل شد. ۳ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید به لوله‌ها افزوده شد و پس از ۲ دقیقه ورتکس کردن، نمونه‌ها در g ۱۴۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و برای استخراج با فاز جامد آماده شدند [۱۵و ۱۶].

۲-۴-۲- استخراج فاز جامد (SPE)

جهت انجام SPE، قبل از آغاز فرایند استخراج، کارتریج‌های C18 (JT. Baker, Netherlands) با استفاده از متانول (۲/۵ میلی‌لیتر) و آب با درجه مورد استفاده در HPLC (۲/۵ میلی‌لیتر) به صورت پی در پی شسته شدند. نمونه آماده شده در مرحله قبلی، از کارتریج عبور داده شد. سپس ستون با آب با درجه HPLC (۳ میلی‌لیتر)، محلول دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۲ مولار (pH=۹، ۳ میلی‌لیتر) و آب با درجه HPLC (۵ میلی‌لیتر) شسته شد و کارتریج تحت جریان ازت خشک گردید. آنتی‌بیوتیک‌ها با ۳/۵ میلی‌لیتر متانول شویش شده و آنتی‌بیوتیک شویش شده تحت جریان ازت خشک گردید. باقی‌مانده خشک مجدداً در ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۲ مولار (pH=۹) حل شد. تیوپ‌ها به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و سپس در g ۴۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ صورت گرفت. سوپرناتانت به ویال‌های تزریق منتقل و ۲۵ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد[۶].

۲-۴-۳- روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC)

فاز متحرک مورد استفاده برای این منظور استونیتریل بود. pH با افزودن اسید فسفریک ۸۵ درصد به استونیتریل روی ۲/۳ تنظیم گردید. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، زمان انجام برای هر نمونه تقریباً ۱۵ دقیقه و ستون مورد استفاده نیز از نوع C18 بود. غلظت آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین (پنی‌سیلین G، آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین) با اندازه‌گیری سطح زیر پیک نمونه، مقایسه آن‌ها با سطح زیر پیک و منحنی کالیبراسیون استانداردهای مربوطه (نمودارهای ۲، ۳ و ۴) در طول موج ۲۵۴ نانومتر با آشکارساز UV تعیین شدند [۶].

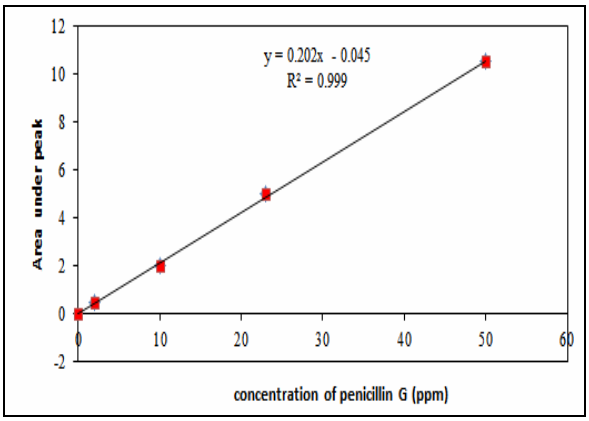

Diagram 2 Standard curve of penicillin G in HPLC test

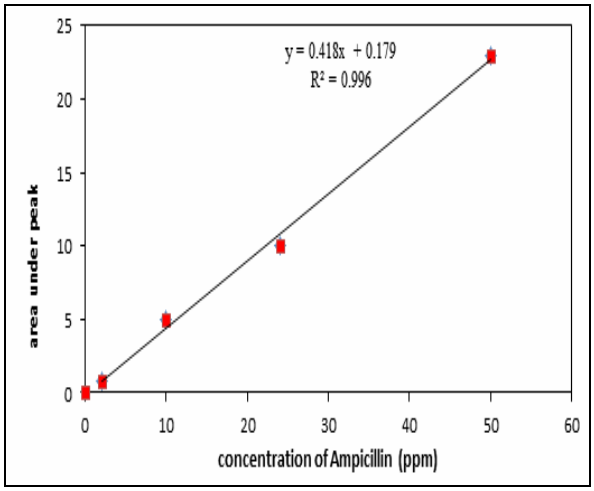

Diagram 3 Standard curve of Ampicillin in HPLC test

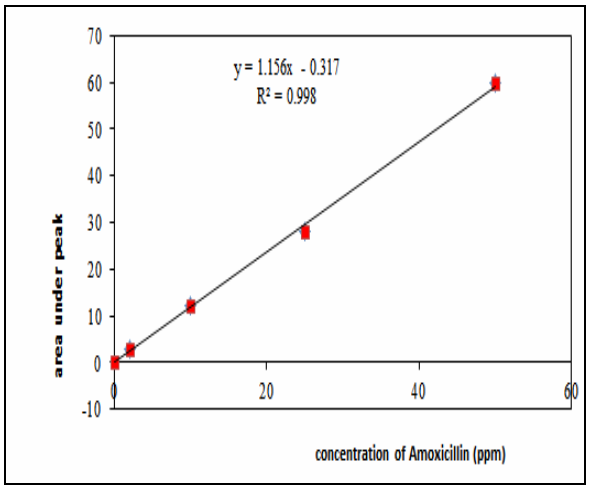

Diagram 4 Standard curve of Amoxicillin in HPLC test

۲-۵- تعیین LOD[15] و LOQ[16]

جدول ۲ میزان LOD و LOQ مربوط به پنی‌سیلین G، آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین را ارائه می‌دهد. به این منظور، ابتدا محلول شاهد (کلیه مواد موجود در ماتریکس نمونه به جز آنالیت) تهیه و بررسی شد. سپس، جهت ردیابی پیک‌ها، یک مخلوط از هر یک از استانداردها به دستگاه تزریق گردید. پس از مشخص شدن زمان خروج هر آنتی بیوتیک، نمونه شاهد ۳ بار به دستگاه تزریق شد و میزان سطح زیر پیک در محل خروج هر پیک گرفته شد و انحراف استاندارد به دست آمد. در نهایت با استفاده از معادلات زیر LOD و LOQ محاسبه شد:

$$LOD = ۳/۳ S_b / m \quad (۲-۳)$$

$$LOQ = ۱۰ S_b / m \quad (۳-۳)$$

در این معادلات S_b انحراف استاندارد شاهد و m شیب خط را نشان می‌دهد.

Table 2 The LOD and LOQ values (ng/ml) for penicillin G, Ampicillin and Amoxicillin

Antibiotic	LOD	LOQ
Penicillin G	0.032	0.095
Ampicillin	0.022	0.068
Amoxicillin	0.004	0.011

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک سنجیده شد. با توجه به غیر نرمال بودن توزیع داده‌های کمی ($p<۰/۰۵$)، در این مطالعه، از آزمون‌های ناپارامتریک کروسکال والیس[17] در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد. نتایج بر اساس میانگین ± انحراف استاندارد گزارش شد. آزمون‌ها هم با دو تکرار انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین میزان پنی‌سیلین موجود در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه به روش الایزا

جدول ۳ میزان آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین (نانوگرم/ میلی‌لیتر) موجود در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه را نشان می‌دهد. از آنجایی که برای هر نمونه دوبار تکرار انجام شده و در آزمون آخر یکی از نمونه‌ها حذف شد؛ بنابراین نتایج آماری برای ۲۹ نمونه ارزیابی شده است. بر اساس نتایج جدول ٤-۱، بین غلظت آنتی‌بیوتیک نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده شد (p=۰/۰۰٦). بالاترین میزان آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های کبد مشاهده شد (۲۸/۳۳ نانوگرم/میلی‌لیتر) اما بین گروه کبد و کلیه تفاوت آماری معنی‌داری دیده نشد (p=۰/۸۹۵). همچنین، بر اساس نتایج مقایسه‌های دوگانه من ویتنی[18] با تصحیح بنفرونی[19]، غلظت بین گروه گوشت و کلیه (p=۰/۰۰۲) و گوشت و کبد (p=۰/۰۱۲) با هم تفاوت داشتند.

15. Limit of Detection
16. Limit of Quantification
17. Kruskal–Wallis
18. Mann–Whitney
19. Boneferroni

Table 3 Comparison of penicillin concentration (ng/ml) in different samples based on ELISA test

Group	Number	Mean ± SD	Quarter	P Value*
Meat	29	22.81 ± 16.63[b]**	4.94(3.51-25.32)	
Liver	29	29.15 ± 27.88[a]	23.29(15.63-35.56)	0.006
Kidney	29	28.33 ± 20.16[a]	22.68(12.87-38.62)	

*Kruskal–Wallis Test

** Different Latin letters on the diagram show a significant difference between the samples

۳-۲- تعیین میزان پنی‌سیلین موجود در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه به روش HPLC

همانگونه که ذکر شد، از ٤٥ نمونه مورد ارزیابی به روش الایزا، ٤٣ نمونه آلوده به آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شدند. در واقع، با استفاده از الایزا غلظت کلی آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین تعیین شد. از این رو، برای تعیین نوع و کمیت این آنتی‌بیوتیک‌ها از بین نمونه‌های آلوده، نمونه‌های با میزان آلودگی یکسان حذف شدند و باقی‌مانده نمونه‌ها توسط HPLC مورد آنالیز قرار گرفتند. جدول‌های ٤، ٥ و ٦ به ترتیب میزان پنی‌سیلین G، آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین را در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه نشان می‌دهد.

نتایج نشان داد که میزان میانگین پنی‌سیلین G، آمپی سیلین و آموکسی سیلین در گروه کبد بالا بود. با این‌حال، بین غلظت آنتی بیوتیک های مورد بررسی در سه گروه گوشت، کبد و کلیه تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

Table 4 concentration of penicillin G (ng / ml) in different samples based on HPLC test

Group	Number	Mean ± SD	Quarter	P Value*
Meat	9	26.90 ± 24.17	19.32(3.82-31.98)	
Liver	9	33.22 ± 33.14	24.09(12.22-44.63)	0.642
Kidney	10	30.02 ± 21.22	21.19(13.07-43.98)	

*Kruskal–Wallis Test

Table 5 concentration of Ampicillin (ng / ml) in different samples based on HPLC test

Group	Number	Mean ± SD	Quarter	P Value*
Meat	9	3.74 ± 3.63	3.12(1.11-4.62)	
Liver	9	8.96 ± 8.67	5.62(3.76-11.10)	0.099
Kidney	10	6.10 ± 3.97	4.63(2.87-10.21)	

*Kruskal–Wallis Test

Table 6 concentration of Amoxicillin (ng / ml) in different samples based on HPLC test

Group	Number	Mean ± SD	Quarter	P Value*
Meat	9	0.89 ± 0.81	0.75(0.002-1.05)	
Liver	9	1.28 ± 1.08	1.32(0.002-2.01)	0.357
Kidney	10	0.68 ± 0.59	0.28(0.002-1.01)	

*Kruskal–Wallis Test

در مقایسه انواع پنی‌سیلین، میزان پنی‌سیلین G بالاترین مقدار را در بین انواع پنی‌سیلین داشت و پس از آن به ترتیب آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، درصد بالایی از نمونه‌ها آلوده به آنتی‌بیوتیک بودند. تعیین باقی‌مانده انروفلوکساین در۲۷۰ نمونه کبد، عضله و کلیه طیور گوشتی جمع‌آوری شده از ۹۰ مرغداری سطح استان تهران طی یک سال توسط HPLC حاکی از حضور این آنتی‌بیوتیک در تمامی این نمونه‌ها بود و ٢٤/٤٤ درصد از نمونه‌ها، حاوی مقادیر بالاتر از MRL بودند[۷]. در مطالعه دیگری، Donkor و همکاران

(۲۰۱۱)، با ارزیابی بقایای آنتی‌بیوتیک ٦٣٤ نمونه از مواد غذایی با منشأهای مختلف حیوانی، شیوع کلی بقایای دارو در غذاهای با منشأ حیوانی ۲۱/۱ درصد گزارش کردند. در این بین، مقادیر شیوع بقایای دارو در مواد غذایی با منشأ حیوانی به این صورت است که گوشت گاو ۳۰/۸ درصد ، شیر بز ۲۹/۳ درصد، گوشت خوک ۲۸/٦ درصد، گوشت گوسفند ٢٤ درصد و تخم مرغ ٦/٨ درصد آلودگی داشتند. نتایج به دست امده از بررسی‌های ما نیز نشان داد ٤٣ نمونه از کل نمونه‌ها به مقادیری مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها آلوده بودند. نتایج مطالعه توکلی و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان‌دهنده حضور بقایای ٤ آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین، کلرامفنیکل، انتروفلوکساسین و پنی‌سیلین در ۹۹ درصد نمونه‌های گوشت مرغ و گوساله بود و البته در این مطالعه ما آلودگی به پنی‌سیلین G، آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین نیز مشهود است. کلیه‌ها و کبد اندام دفعی محسوب می‌شوند و تجمع آنتی‌بیوتیک‌ها در اندام‌های دفعی بیشتر است. اما، توزیع آنتی‌بیوتیک در گوشت کمتر است [۲]. از طرفی، در نمونه‌های گوشت امکان کلین آپ، سریع و مناسب بوده و اثرات ماتریکس روی استخراج آنتی‌بیوتیک کمتر است [١٤، ١٩-١٧]. به همین دلیل، در پژوهش حاضر نیز نمونه‌های کبد و کلیه بالاترین میزان آلودگی به آنتی‌بیوتیک را داشتند.

۳-۳- مقایسه نتایج الایزا و HPLC در سنجش میزان آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین

با بررسی نتایج حاصل از الایزا، برای تائید آزمون و اعتبار سنجی روش الایزا، از تست HPLC استفاده شد. بدین منظور نمونه‌هایی که در آزمون الایزا نتایج مشابهی داشتند حذف شده و باقی نمونه‌ها برای آزمون HPLC آماده سازی شدند. در ادامه مقایسه نتایج آزمون الایزا و HPLC برای نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه به تفکیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون‌های الایزا و HPLC جهت تعیین میزان آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین در نمونه‌های گوشت مورد مقایسه قرار گرفت. در بین نمونه‌های مورد بررسی، نمونه ۲ و ۱ به ترتیب بالاترین و کمترین میزان باقیمانده پنی‌سیلین را داشتند. این تفاوت می‌تواند به اختلاف در نوع نمونه و محل جمع‌آوری آن مربوط باشد. در مقایسه روش الایزا و HPLC در بیشتر نمونه‌های گوشت، روش HPLC توانست مقادیر اندک آنتی‌بیوتیک را ردیابی کند که می‌تواند به حساسیت بالای این روش برای تشخیص پنی‌سیلین مربوط باشد(Dia5). در نمونه‌های کبد همانند نمونه‌های گوشت، آزمون HPLC در بعضی نمونه‌ها توانایی بالاتری برای تعیین میزان آنتی‌بیوتیک ازخود نشان داد اما در برخی نمونه‌ها نیز آزمون HPLC و الایزا کارایی یکسانی برای ردیابی پنی‌سیلین از خود نشان دادند(Dia6). در مورد نمونه‌های کلیه نیز مقایسه نتایج آزمون برای نمونه‌های مختلف، حاکی از همخوانی نتایج بدست آمده در آزمون الیزا با نتایج HPLC می باشد (Dia7).

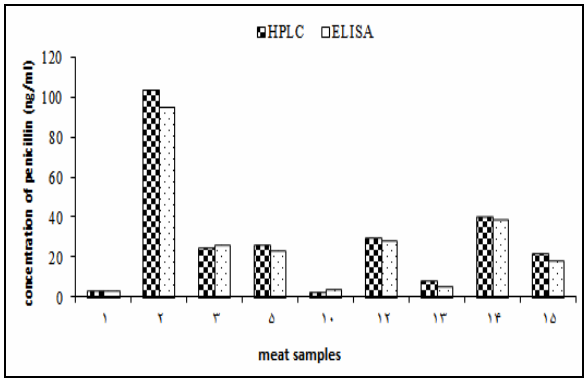

Diagram 5 Comparison of penicillin concentration of meat samples determined by ELISA and HPLC

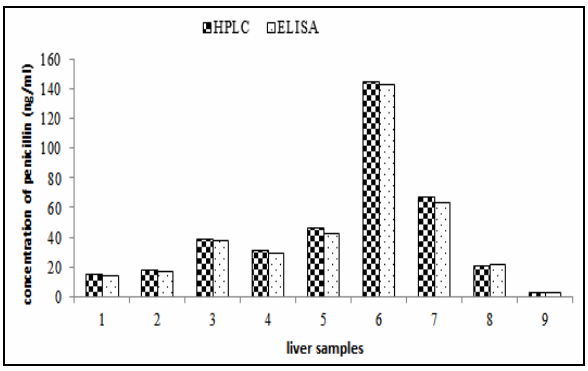

Diagram 6 Comparison of penicillin concentration of liver samples determined by ELISA and HPLC

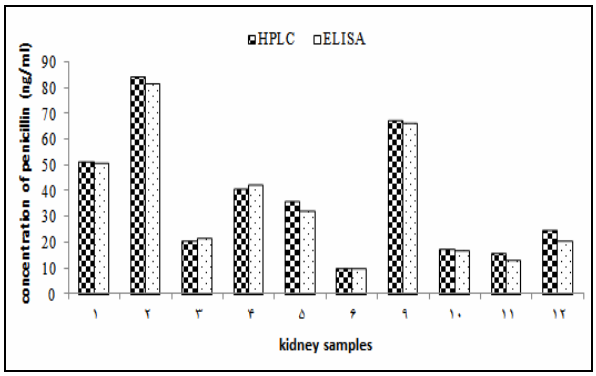

Diagram 7 Comparison of penicillin concentration Of kidney samples determined by ELISA and HPLC

در تمامی روش‌های الایزا لازم است ساختار بتا-لاکتام تغییر کند تا آنتی‌بادی با انتخاب پذیری کافی تشکیل گردد. بنابراین، روش‌های الایزا از حساسیت بالا برای تشخیص پنی‌سیلین برخوردار نبوده و این عیب به ویژه در مورد آمینوپنی‌سیلین‌ها که متداول‌ترین پنی‌سیلین‌های مورد استفاده در جهان می‌باشند، بیشتر مشهود است. بنابراین، لزوم استفاده از روش‌های دقیق‌تر نظیر HPLC پس از تشخیص اولیه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین در نمونه‌ها، جهت کمی‌سازی الزامی عنوان شده است [۱]. از طرفی، الایزا اغلب پتانسیل بالایی برای اتصال غیر اختصاصی بین آنالیت‌های غیر هدف و آنتی‌بادی‌ها دارد و در نتیجه مستعد اثرات ماتریکس است. ترکیبات شیمیایی موجود در نمونه‌های حیوانی یا عصاره‌های نمونه مثل پروتئین، چربی، حلال‌ها و سایر ترکیبات ممکن است روی اتصال آنتی‌بادی و آنالیت مورد نظر مؤثر باشد. این اثر ماتریکس یک مشکل متداول برای الایزا به شمار می‌آید که حساسیت و اعتبار الایزای رقابتی را کاهش داده و موجب مثبت شدن کاذب با کاهش توسعه رنگ شود [۱۷]. در نتیجه، دلیل اختلاف نتایج الایزا و HPLC در پژوهش حاضر نیز قابل توجیه خواهد بود. در مطالعه Do و همکاران (۲۰۱۱)، جهت تشخیص حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در گوشت خوک (سال ۲۰۱۵-۲۰۱٤)، از صد نمونه، ۱۸ نمونه توسط کیت میکروبیولوژیکی مثبت تشخیص داده شدند در حالی‌که در روش LC-MS-MS سولفامتازین در ۲۳ نمونه وجود داشت.

۳-٤- تعیین همبستگی بین نتایج الایزا و HPLC

برای این منظور غلظت آنتی‌بیوتیک‌های تعیین شده توسط الایزا در برابر نتایج حاصل از HPLC ترسیم شد و ضریب همبستگی تعیین گردید. نمودارهای 8، 9 و 10 به ترتیب همبستگی بین نتایج الایزا و HPLC را در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه نشان می‌دهد.

همانطور که مشخص است در همه نمونه‌ها همبستگی بالایی بین نتایج الایزا و HPLC وجود داشت در واقع، HPLC نتایج حاصل از الایزا را تأیید کرد. ارتباط خوبی بین نتایج الایزا و HPLC برای تعیین میزان بقایای نئومایسین در نمونه‌های غذایی حیوانی نیز مشاهده شده است [۱۷].

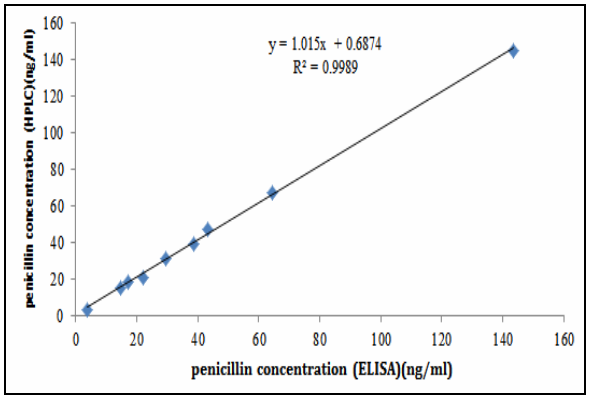

Diagram 8 Correlation between of result Of ELISA and HPLC in Liver samples

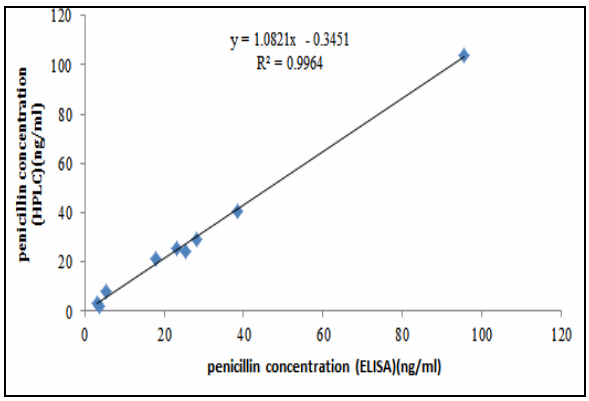

Diagram 9 Correlation between of result Of ELISA and HPLC in Meat samples

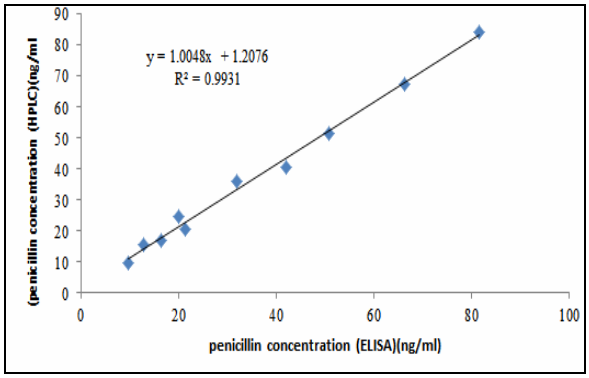

Diagram 10 Correlation between of result Of ELISA and HPLC in kidney samples

در مطالعه Tajik و همکاران (۲۰۱۰)، نیز نتایج حاصل از HPLC برای تعیین کلرامفنیکل در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه در راستای نتایج الایزا بود. Johnson و همکاران (۲۰۱۲)، از روش دو مرحله‌ای کیت الایزا-HPLC برای تشخیص و تعیین کمی آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، مالاکیت گرین، نیترو فوران و فلوروکوئینولون‌ها در نمونه‌های میگو استفاده کردند و نتایج حاکی از تأیید نتایج الایزا توسط کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف‌سنج جرمی بود.

٤- نتیجه گیری

بررسی بقایای آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه نشان داد ۹۵ درصد از نمونه‌ها حاوی این ترکیبات بودند. همچنین آزمون HPLC به عنوان یک روش تائیدی نتایج حاصل از الایزا تائید و تکمیل نمود. در این پژوهش نشان داده شد؛ آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده‌ای در صنعت دام و طیور استفاده می‌شوند و عدم رعایت دوره دفع دارویی قبل از کشتار، استفاده غیر مجاز به وسیله دامداران، تجویز بیش از حد توصیه شده و فقدان روش‌های سریع، دقیق و ارزان قیمت جهت کنترل بقایای آنتی‌بیوتیکی سبب شده، باقی‌مانده این داروها در مواد غذایی به طور قایل ملاحظه‌ای مشاهده شود.

با این حال در برخی از کشورهای جهان قوانین و مقرراتی در خصوص کنترل آلودگی مواد غذایی به آنتی‌بیوتیک‌ها و عرضه مواد غذایی سالم وضع شده است. برای مثال در آلمان یک درصد لاشه‌های گاوهای گوشتی و دو درصد لاشه‌های گوساله‌های کشتار شده باید به این منظور آزمایش شوند و یا احشا خوراکی که به صورت وارداتی وارد انگلستان می‌شوند قبل از توزیع در بازار می‌بایست توسط آزمایشگاه‌های وابسته به دولت، از نظر آلودگی به آنتی‌بیوتیک ارزیابی گردد. این موضوع ضرورت پژوهش‌های گسترده‌تری را به منظور شناسایی سایر آنتی‌بیوتیک‌ها و داروها در انواع فراورده‌های غذایی با منشأ دامی (لبنیات، گوشت، مرغ، ماهی، تخم مرغ، عسل و غیره) با هدف کمک به برنامه‌ریزی برای ایجاد نظارت‌های لازم و بهینه کردن زنجیره تولید مواد غذایی جهت حفظ سلامت مصرف‌کنندگان و رفع موانع صادرات می‌طلبد.

بنابراین سیاست‌های کلی در این زمینه باید بر اساس چهار اصل پیشگیری، پیگیری، نظارت و آزمایشات اکتشافی بنا گردد. علاوه بر این، یافتن آزمایشات سریع و حساس با کمترین زمان و بیشترین حساسیت آلودگی کمک‌کننده خواهد بود.

٥- منابع

[1] Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A. & Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29(9), 1038-1049.

[2] Vahedi, N., Motaghdi, A., and Golchin, M. (2011). Determination of Antibiotic Residues in Industrial Poultry Carcasses in Mazandaran Province using the F.P.T Method, the Quarterly Iranian Food Science and Nutrition, volume 8(1), pp. 65-72[In Persian].

[3] Reig, M. & Toldra, F. (2008).Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. Meat Science, 78, 60–67.

[4] Pirsaheb, M., Khamoutian, R., Dargahi, A., Torabi, S., & Ghasemzadeh, A. (2014). Study of Antibiotic Residues in Milk in Iran, Jiroft University of Medical Sciences, volume 1(2), pp. 94-105[In Persian]

[5] Heshmati, A. (2015). Impact of cooking procedures on antibacterial drug residues in foods: A review. Journal of Food Quality and Hazards Control, 2, 33-37.

[6] Tavakoli, H. R., Firouzabadi, M. S., Afsharfarnia, S., Jafari, N. J. & Sa'adat, S. (2015). Detection antibiotic residues by HPLC method in chicken and claves meat in diet of a military center in Tehran. Acta Medica Mediterranea, 31, 1427-1433.

[7] Rokni, N., Kamkar, A., Salehzadeh, F., & Madani, R. (2007). Study of Enrofloxacin Residues in Broiler Tissues using HPLC, the Quarterly Iranian Food Science and Technology, volume 4(2), pp. 11-16[In Persian]

[8] Rahimi A. & Jafarian, M. (2008). Study of Chloramphenicol Residues in Poultry Meat Tissues in Isfahan using the ELISA Method, the journal Veterinary Clinical Pathology, volume 2(3), pp. 203-207[In Persian]

[9] Movassagh, M. H. (2012). Detection of Antibiotic Residues in Raw Cow Milk in the Ilkhchi District (Southwest of Tabriz), in Spring of 2009, Journal of Food Science and Nutrition, volume 9(3), pp. 89-94[In Persian]

[10] Rahimabadi, A., Ospour, Y., and Sayehban, P. (2016). Study of Tetracycline and Oxytetracycline Residues in Milk at Milk Collection Centers in Gilan Province using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Iranian Veterinary Journal, volume 12(1), pp. 118-125[In Persian]

[11] Ghanavi, Z., Mollayi, S. & Eslami, Z. (2013). Comparison between the amount of penicillin G residue in raw and pasteurized

milk in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology, 6(7), e12724.

[12] Ehsani, A. & Hashemi, M. (2015). Determination of antibacterial drug residues in Commercial eggs distributed in Urmia, Iran. Journal of Food Quality and Hazards Control, 2(2), 61-65.

[13] Wang, H., Ren, L., Yu, X., Hu, J., Chen, Y., He, G. & Jiang, Q. (2017). Antibiotic residues in meat, milk and aquatic products in Shanghai and human exposure assessment. Food Control, 80, 217-225.

[14] Tajik, H., Malekinejad, H., Razavi-Rouhani, S. M., Pajouhi, M. R., Mahmoudi, R. & Haghnazari, A. (2010). Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. Food and Chemical Toxicology, 48(8), 2464-2468.

[15] Shi, X., Wu, A., Zheng, S., Li, R. & Zhang, D. (2007). Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of chloramphenicol residues in foods. Journal of Chromatography B, 850(1), 24-30.

[16] Akbari-adergani, B. & Shirkhan, F. (2016). Malt and Malt Products (Fundamentals of Production and Processing, Standards and Test Methods), the Food and Drug Administration, pp. 166-170[In Persian]

[17] Wang, S., Xu, B., Zhang, Y. & He, J.X. (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.

[18] Do, M. H. N., Yamaguchi, T., Okihashi, M., Harada, K., Konishi, Y., Uchida, K. & Do Nguyen, P. (2016). Screening of antibiotic residues in pork meat in Ho Chi Minh City, Vietnam, using a microbiological test kit and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Food Control, 69, 262-266.

[19] Johnson, J. D. (2014). Detection and confirmation of veterinary drug residues in commercially available frozen shrimp (Doctoral dissertation, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The School of Nutrition and Food Sciences by Jessica Danielle Johnson BS, Louisiana State University).

Detection and Evaluation of penicillin base antibiotics residue in the kidney, liver and meat of the cow distributed in Tehran's municipal markets by using ELISA kits followed by high performance liquid chromatography

Jalali, M. [1], Ataee, M. [2], Akbari-adergani, B. [3*]

1. Departement of Agriculture College of food science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran
2. Deparment of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran
3. Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

(Received: 2018/10/27 Accepted:2019/08/05)

Antibiotic residues in meat and other foods of animal origin have adverse effects on consumer health. In this study, first, penicillin residues of 45 samples (15 meat samples, 15 liver samples and 15 kidney samples) randomly collected from Tehran retailers were evaluated by ELISA method. Based on ELISA results, from total 45 samples, 43 cases were diagnosed as contaminated sample for antibiotic residues. The highest penicillin amount was observed for liver samples but there was no significant difference between kidney and liver samples (p=0.895). Subsequently, samples with equal amounts of penicillin were removed and other samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) regarding penicillin G, ampicillin and amoxicillin. Penicillin G had the most value among other penicillin groups followed by ampicillin and amoxicillin, respectively. Liver samples showed higher levels of penicillin groups compared to meat and kidney samples, but no significant difference was found among them. Also, there was good correlation between ELISA and HPLC results and R^2 of all samples was greater than 0.99. Moreover, it was demonstrated that antibiotic residues of some samples were above the maximum residue limit (MRL) stated by world standards. Obtained results show the necessity of monitoring antibiotic residues in food of animal origin by related organizations especially the institute of standards & industrial research of Iran and veterinary organization.

Keywords: Meat, Liver, Kidney, Penicillin, Antibiotic residues, ELISA, HPLC.

* Corresponding Author E- Mail Address: analystchemist@yahoo.com