شاپا الکترونیکی
ISSN – ۲۷۸۳-۰۷۱۳
پیشرفت و توسعه استان کرمانشاه

Survey on the antibiotic residues in rainbow trout in the Kermanshah markets through a Four-Plate test

Yasser Shahbazi
Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
(Corresponding Author) yasser.shahbazi@yahoo.com

Nassim Shavisi
Faculty of Veterinary Medicine, Razi University,
Kermanshah, Iran.

Negin Karami
Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran,
Tehran, Iran.

Abstract

The aim of the present study was to investigate the presence of antibiotic residues in rainbow trout fishes through a Four-Plate test. In this study, 240 rainbow trout samples (weight = 800 g - 1700 g) were purchased from the main local markets of Kermanshah city during four seasons, including summer, spring, autumn, and winter 2020-2021. The results of this study showed that based on the inhibition zone diameter at pH 6, 16 samples were collected from Lorestan province (20%), 13 samples were collected from Kermanshah province (16.25%), and 6 samples were collected from Kurdistan province (7.5%) had antibiotic residues, i.e. the inhibition zone diameter was more than 2 mm. Accordingly, the main antibiotics consumed in rainbow trout farming in Lorestan, Kermanshah, and Kurdistan provinces were probably the fluoroquinolone family. The results of the present study indicate that the rainbow trout samples collected from the main local markets of Kermanshah city had no remarkably antibiotic residues.

Keywords: Antibiotic residues; Rainbow trout; Kermanshah

Progress and development of Kermanshah province
Kermanshah Management and Planning Organization, 2023, Vol. 2, No. 4, pp 127-139.
Received: 30/06/2023 - **Accepted:** 18/10/2023

پیشرفت و توسعه استان کرمانشاه
سازمان مدیریت و برنامه ریزی استان کرمانشاه
شاپا الکترونیکی
ISSN – ۲۷۸۳-۰۷۱۳

بررسی بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها در ماهیان قزل‌آلای بازار کرمانشاه به روش چهارپلیت تست

یاسر شهبازی
دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
(نویسنده مسئول) yasser.shahbazi@yahoo.com
نسیم شاویسی
دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
nassim.shavisi@yahoo.com
نگین کرمی
دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
neginkarami87@gmail.com

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، غربالگری حضور باقیمانده‌های دارویی در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از روش چهارپلیت تست بود. در این مطالعه، مجموعاً تعداد ۲۴۰ نمونه ماهی قزل‌آلای پرورشی (وزن ۸۰۰ تا ۱۷۰۰ گرم) در مدت یک‌سال (تابستان، بهار، پاییز و زمستان سال ۱۳۹۹) با همکاری ناظر محترم طرح از مراکز عمده عرضه و فروش ماهی قزل‌آلای شهر کرمانشاه خریداری گردید. نتایج این مطالعه نشان داد، از تعداد ۲۴۰ نمونه فیله ماهی قزل‌آلا مورد بررسی بر اساس هاله عدم رشد در ۶ pH، ماهیان پرورشی در استان لرستان ۱۶ مورد (۲۰٪)، استان کرمانشاه ۱۳ مورد (۱۶/۲۵٪) و استان کردستان ۶ مورد (۷/۵٪) دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی یعنی قطر هاله عدم رشد برابر یا بیشتر از ۲ میلی‌متر بودند. بر این اساس، احتمالاً بیشترین آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در پرورش ماهی قزل‌آلا در استان لرستان، کرمانشاه و کردستان مربوط به خانواده فلوروکینولون‌ها می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده آلودگی کم ماهی قزل‌آلای پرورشی موجود در مراکز عرضه و فروش بازار شهر کرمانشاه به بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک، قزل‌آلای رنگین کمان، کرمانشاه

سازمان مدیریت و برنامه ریزی استان کرمانشاه
فصلنامه پیشرفت و توسعه استان کرمانشاه، دوره ۲، شماره ۴، ص ۱۳۹-۱۲۷.
تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۴/۰۹ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۷/۲۶

۱- مقدمه

افزایش تولیدات منابع دریایی و توسعه آبزی‌پروری در دنیا باعث افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ضدقارچ‌ها و مواد شیمیایی مختلف شده است (کلینیک و کاکلی[1]، ۲۰۰۸). در صنعت آبزی‌پروری، استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های باکتریایی منجر به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌هایی نظیر آئروموناس هیدروفیلا[2]، آئروموناس سالمونیسیدا[3]، ادواردزیلا تاردا[4]، ادواردزیلا ایکتالوری[5]، لیستونلا انگوئیلاروم[6]، ویبریو سالمونیسیدا[7] و یرسینیا راکری[8] شده است. همچنین، مصرف مواد غذایی حاوی آنتی‌بیوتیک با دوز پایین می‌تواند باعث افزایش مقاومت انسان به سویه‌های باکتریایی مختلف گردد (جی[9] و همکاران، ۲۰۰۵).

به منظور حفظ سلامت انسانی، اتحادیه اروپا[10] حداکثر میزان باقیمانده مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها را برای ماهی و فرآورده‌های دریایی مختلف تعریف کرده است (کلینیک و کاکلی، ۲۰۰۸). با این وجود، در میزان استفاده از این داروها و حتی اجازه مصرف‌کردن یا مصرف نکردن آنها بین سازمان‌های مختلف نظیر اتحادیه اروپا، کدکس[11]، سازمان غذا و داروی آمریکا[12] و سازمان خوار و بار جهانی[13] اختلافاتی وجود دارد. برای مثال، فقط مقررات اتحادیه اروپا اجازه استفاده از فلوروکینولون‌ها را در ماهیان پرورشی داده است. بر اساس پیشنهاد اتحادیه اروپا، حداکثر میزان انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در بافت‌های مختلف ماهی ۱۰۰ µg/kg می‌باشد (بارانی و فلاح[14]، ۲۰۱۴). کینولون‌ها گروهی از آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک هستند که در درمان بیماری‌های عفونی در صنعت آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند. مکانسیم اثر فلوروکینولون‌ها به صورت باکتری‌کشی و نقش آن‌ها در ممانعت از آنزیم DNA gyrase دیواره سلولی باکتری‌ها که در تکثیر DNA نقش دارد، می‌باشد (فدائی‌فرد[15]، ۲۰۱۲). یکی دیگر از مهم‌ترین دسته آنتی‌بیوتیک‌ها که به‌صورت گسترده در صنعت آبزی‌پروری بکاربرده می‌شود، داروهای خانواده تتراسایکلین‌ها شامل اکسی‌تتراسایکلین، تتراسایکلین، کلروتتراسایکلین و داکسی‌سایکلین می‌باشند. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم توجه پرورش‌دهندگان ماهی به توصیه‌های سازمان دامپزشکی در خصوص رعایت مدت زمان دوره منع کشتار سبب افزایش بیش از حد مجاز باقیمانده‌های این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در این ماده غذایی می‌گردد (احمدی[16] و همکاران، ۲۰۱۵). از دیگر داروهای شناسایی‌شده در صنعت

1. Kilinc & Cakli
2. Aeromonas hydrophila
3. Aeromonas salmonicida
4. Edwardsiella tarda
5. Edwardsiella ictaluri
6. Listonella anguillarum
7. Vibrio salmonicida
8. Yersinia ruckeri
9. Jay
10. European Commission
11. Codex Alimentarius
12. United States Food and Drug Administration (US FDA)
13. Food and Agriculture Organization (FAO)
14. Barani & Fallah
15. Fadaeifard
16. Ahmadi

آبزی‌پروری می‌توان به سولفونامیدها اشاره کرد. این دسته از داروها برای درمان بیماری‌های با منشأ باکتریایی نظیر آئروموناس هیدروفیلا، آئروموناس سوبریا[1]، سودوموناس فلوروسنس[2] و ادواردزیلا تاردا استفاده می‌شود. فلورفنیکل نیز یکی دیگر از داروهای سنتتیکی است که نقش مؤثری در کنترل بیماری‌های باکتریایی در ماهیان پرورشی دارد (بارانی و فلاح، ۲۰۱۴؛ سواپنا[3] و همکاران، ۲۰۱۲).

در سال‌های اخیر، از روش‌های تشخیصی مختلفی برای تعیین باقیمانده‌های دارویی در مواد غذایی استفاده شده است. این روش‌ها عبارتند از: روش‌های میکروبی، روش‌های ایمونوشیمیایی و روش‌های فیزیکوشیمیایی. انتخاب روش آنالیز به نوع آنتی‌بیوتیک، محدودیت‌های زمانی مورد انتظار، حساسیت روش و هزینه آن بستگی دارد (تاجیک[4] و همکاران، ۲۰۱۰). روش‌های میکروبی به علت هزینه نسبتاً کم از رایج‌ترین روش‌ها جهت تشخیص باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی می‌باشند. روش چهار پلیت تست[5] به‌عنوان یک روش میکروبی معتبر، با سرعت و بازدهی بالا برای غربالگری باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش توانایی تشخیص تعدادی از باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی شامل بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین‌ها، ماکرولیدها، سفالوسپورین‌ها، کینولون‌ها، پلی‌پپتیدها، آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و آمفنیکل‌ها را در مواد غذایی با منشأ دامی مانند گوشت قرمز، امعاء و احشاء مانند کبد و کلیه، تخم مرغ، ماهی و میگو دارد (رحیمی[6] و همکاران، ۲۰۱۸). علی‌رغم قوانین سخت‌گیرانه در مورد باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی با منشأ دامی، مطالعات متعددی حضور باقیمانده‌ها را در بسیاری از مواد غذایی گزارش کرده‌اند (تاجیک و همکاران، ۲۰۱۰؛ رحیمی و همکاران، ۲۰۱۸؛ شهبازی[7] و همکاران، ۲۰۱۵؛ شالابی[8] و همکاران، ۲۰۱۱؛ بارانی و فلاح، ۲۰۱۴؛ کلینیک و کاکلی، ۲۰۰۸). نظر به اینکه باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی اثرات زیان‌آوری در مصرف‌کنندگان ایجاد می‌کند، کنترل کیفی و کمی آنها در صنعت آبزی‌پروری به‌ویژه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان لازم و ضروری است. لذا، هدف از مطالعه حاضر، غربالگری حضور باقیمانده‌های دارویی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با استفاده از روش چهارپلیت تست بود.

۲- مواد و روش‌کار

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه، مجموعاً تعداد ۲۴۰ نمونه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی (وزن ۸۰۰ تا ۱۷۰۰ گرم) در مدت یک‌سال (تابستان، بهار، پاییز و زمستان ۱۳۹۹) با همکاری ناظر محترم طرح از مراکز عمده عرضه و فروش ماهی قزل‌آلای شهر کرمانشاه خریداری گردید. دسته‌بندی نمونه‌ها بر اساس استان محل پرورش آنها به سه دسته استان کرمانشاه، استان لرستان و استان کردستان صورت گرفت. بر این اساس، تعداد ۶۰ نمونه ماهی در هر فصل

1. Aeromonas sobria
2. Pseudomonas fluorescens
3. Swapna
4. Tajik
5. Four Plate Test (FPT)
6. Rahimi
7. Shahbazi
8. Shalaby

نمونه‌برداری (کردستان = ۲۰ نمونه، لرستان = ۲۰ نمونه و کرمانشاه = ۲۰ نمونه) جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری به صورت تصادفی ساده و با فاصله بین ۷ تا ۱۰ روز یک‌بار صورت گرفت. پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها به‌صورت جداگانه، در شرایط استریل، در کنار یخ و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی منتقل شدند. در آزمایشگاه، پس از ثبت مشخصات و قطع سر، دم و باله‌ها و همچنین خارج‌کردن امعاء و احشاء ماهی، فیله‌های به‌دست‌آمده تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۲- تعیین بقایای آنتی‌بیوتیکی به روش چهار پلیت

۲-۲-۱-تهیه محیط‌های کشت مورد استفاده

طبق دستورالعمل شرکت سازنده، مقدار لازم از پودر خشک محیط مولر هینتون‌آگار به‌وسیله ترازوی دیجیتال وزن و با افزودن آب مقطر و با حرارت ملایم حل گردید. قبل از جوشیدن و شفاف‌شدن محیط، با توجه به اینکه در این روش باید محیط مولر هینتون‌آگار با سه pH ۶، ۷/۲ و ۸ استفاده شود، با استفاده از pH متر و با افزودن اسیدکلریدریک ۱ نرمال و هیدروکسید سدیم ۱ نرمال 1های موردنظر تنظیم گردید. سایر محیط‌های کشت موردنیاز شامل نوترینت براث، نوترینت آگار و تریپتیک سوی براث نیز مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده و مشابه با نحوه تهیه محیط کشت مولر هینتون‌آگار آماده‌سازی گردید. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲۰ پوند بر اینچ مربع استریل گردید.

۲-۲-۲- تهیه شیرابه از نمونه‌ها

جهت تهیه شیرابه، پس از انجمادزدایی نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ابتدا مقدار ۵ گرم از هر کدام از نمونه‌ها به‌وسیله ترازوی دیجیتال توزین گردید و در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه هموژنایزر با دور ۷۰۰ rpm همگن گردید. نهایتاً، نمونه‌های هموژن شده به مدت ۱۵ دقیقه به‌وسیله دستگاه سانتریفیوژ با دور g × ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و شیرابه از نمونه مورد نظر تهیه گردید (شهبازی و همکاران، ۲۰۱۵).

۲-۲-۳- فعال‌کردن باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس

ابتدا میز کار استریل گردید. ویال باکتری روی یک تامپون روی میز در کنار شعله قرار داده شد. در محلی که پنبه درون ویال قرار گرفته الکل ریخته و روی آن با قلم الماس خط انداخته شد. مجدداً، روی همان قسمت الکل ریخته و سپس با تامپون خشک شد. با فشار دست ویال از محل خراش شکسته شد. با استفاده از پنس استریل، پنبه درون ویال خارج شد. با پیپت پاستور استریل ۰/۳ تا ۰/۴ میلی‌لیتر از محیط کشت TSB[1] استریل به ماده خشک درون ویال اضافه شد؛ و به‌دقت مخلوط شد تا به شکل سوسپانسیون یکنواخت درآمد. سوسپانسیون تهیه شده به

1. Tryptic Soy Broth (TSB)

درون یک لوله آزمایش بزرگ حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط TSB منتقل شد و سپس یک قطره از سوسپانسیون روی محیط کشت نوترینت‌آگار به‌صورت خطی کشت داده شد. در مرحله بعد، پلیت و لوله حاوی باکتری در دمای انکوباسیون مناسب هر باکتری قرار داده شدند. بدین‌صورت که باکتری باسیلوس سوبتیلیس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

۲-۲-٤- آماده‌سازی کشت باکتریایی

باکتری‌های لیوفیلیزه باسیلوس سوبتیلیس (ATCC 6633) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) تهیه‌شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران[1] فعال شدند. کشت‌های باکتریایی روی محیط کشت نوترینت آگار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند و با دو بار عمل ساب‌کالچر[2] قبل از استفاده مجدد فعال شدند. سپس، به‌منظور تهیه سوسپانسیون باکتری باسیلوس سوبتیلیس دو تا سه کلونی خوب رشدکرده با لوپ استریل جدا شدند و در داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط TSB تلقیح و به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند تا کدورت حاصل گردد. سپس، محیط حاوی باکتری را ورتکس کرده تا همگن شود. کدورت نوری[3] کشت ۱۸ ساعته با کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۰ نانومتر مشخص شد و بلافاصله قبل از استفاده با محیط TSB و در طول موج ۶۶۰ نانومتر و با کدورت نوری ۰/۶۵ (معادل با ۱۰۶ CFU/ml) استاندارد گردید. جهت تأیید تشخیص سلول‌های باکتری بعد از رقت‌سازی و انتخاب رقت مناسب بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد سلول‌های زنده در پلیت با تعداد کلونی باکتری ۳۰۰-۳۰ شمارش شدند و کدورت نوری آنها تعیین گردید (خان‌ناظر[4] و همکاران، ۱۹۹۹).

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط TSB تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. بعد از ۱۸ ساعت، کدورت محیط گرمخانه‌گذاری شده در مقایسه با کدورت نیم مک‌فارلند استاندارد تنظیم گردید. برای تهیه استاندارد نیم مک‌فارلند، ابتدا دو محلول اسیدسولفوریک (w/w) ۱ درصد و محلول آبی (w/w) ۱/۷۵ درصد از کلریدباریم تهیه نموده و سپس ۰/۰۵ میلی‌لیتر کلریدباریم را به ۹/۹۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک اضافه گردید. بدین ترتیب، محلول استاندارد نیم مک‌فارلند با غلظت تقریبی ۱۰۸ × ۱/۵ سلول در هر میلی‌لیتر به‌دست آمد. ابتدا جذب نوری استاندارد نیم مک‌فارلند در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد که جذب ۰/۰۴ را نشان داد (معادل با ۱۰۸ CFU/ml × ۱/۵). سپس، محیط حاوی باکتری ورتکس‌شده در همان طول موج خوانده شد. با مقایسه این دو عدد می‌توان به نسبت غلظت باکتری در مقایسه با نیم مک‌فارلند پی برد؛ که با توجه به آن باکتری تا غلظت مناسب رقت‌سازی شد. در ادامه، باکتری باسیلوس سوبتیلیس روی محیط مولر هینتون آگار استریل با pHهای ۶، ۷/۲ و ۸

1. Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST)
2. Sub-culture
3. Optical density
4. Khan-Nazer

و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس روی محیط مذکور با pH ۸ کشت داده شدند (استافیلوکوکوس اورئوس: CFU/ml ۱۰۶ × ۳/۶ و باسیلوس سوبتیلیس: CFU/ml ۱۰۵ × ۱/۵) (پیکمات[1] و همکاران، ۲۰۰۹).

۲-۲-۵- بررسی وجود یا عدم وجود آنتی‌بیوتیک در شیرابه‌های تهیه شده

بعد از تنظیم نمودن کدورت سوسپانسیون‌های باکتریایی، یک سواپ استریل را در سوسپانسیون قرار داده، آن را به دیواره لوله آزمایش در بالای سطح مایع محکم فشرده و سپس سواپ را چرخانده تا مایع اضافی خارج شود. سواپ را در سطح داخل محیط کشت مولر هینتون‌آگار چندین بار به‌صورت خطی کشیده، پلیت را ۹۰ درجه بعد از هر بار کشت‌دادن با سواپ چرخانده تا اطمینان حاصل گردد که مایع تلقیحی به‌صورت یکنواخت روی سطح آگار پخش شده است.

روی هر پلیت محیط مولر هینتون آگار حاوی باکتری، سه عدد دیسک کاغذی به وسیله پنس استریل برای هر نمونه قرار داده و به آرامی با نوک پنس به طرف پایین و به داخل آگار فشار داده تا از تماس کامل دیسک با سطح آگار اطمینان حاصل گردد. سپس، از شیرابه تهیه شده از هر نمونه به‌میزان ۱۰ میکرولیتر به هر دیسک منتقل کرده و پس از نگهداری به مدت دو ساعت در دمای اتاق جهت نفوذ شیرابه به داخل محیط کشت حاوی باکتری، پلیت‌های حاوی باکتری باسیلوس سوبتیلیس در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۸ ساعت و پلیت‌های حاوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. دیسک اکسی‌تتراسایکلین به‌عنوان کنترل مثبت بر روی بعضی از پلیت‌ها در روزهای متفاوت آزمایش قرار داده شد.

بعد از انکوباسیون، نتایج بر اساس ایجاد هاله شفاف (منطقه مهار رشد) در اطراف دیسک حاوی شیرابه نمونه قرائت شد و در صورت ایجاد هاله عدم رشد قطر آن توسط کولیس اندازه‌گیری و ثبت گردید. قطر هاله عدم رشد مساوی و یا بزرگتر از ۲ میلی‌متر از نظر بقایای آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان مثبت و کمتر از ۲ میلی‌متر منفی قلمداد گردید (کونن-دیریک[2] و همکاران، ۱۹۹۵).

۲-۲-۶-آنالیز آماری

نرم افزار SPSS ورژن ۲۱ جهت آنالیز آماری داده‌ها به کار رفت. آزمون‌های Chi-square ($\chi 2$) و Fisher's exact test جهت مقایسه حضور بقایای آنتی‌بیوتیکی در استان‌های مختلف به روش چهارپلیت استفاده شد. مقدار $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

1. Pikkemaat
2. Koenen-Dierick

۳- نتایج و بحث

روش غربالگری اولین قدم در بررسی نمونه‌های مواد غذایی برای اثبات وجود یا عدم وجود بقایای دارویی است. این روش بایستی ارزان بوده، قابلیت انجام با تعداد بالای نمونه‌ها و حداقل نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب را داشته باشد. همچنین، تمام نمونه‌های حاوی بقایای آنتی‌بیوتیک را در سطح بالای حداکثر مقدار مجاز باقیمانده دارویی مثبت نشان دهد. حداکثر مقدار مجاز باقیمانده دارویی بر اساس نوع و اندازه باقیمانده، به‌گونه‌ای در نظر گرفته می‌شود که هیچ‌گونه مخاطره‌ای از دیدگاه سم‌شناسی برای سلامت انسان نداشته باشد.

یکی از روش‌هایی که به‌طور معمول جهت غربالگری باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی و حتی در جیره دامی مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش‌های کیفی مانند روش‌های میکروبی است (اوکرمن[1] و همکاران، ۱۹۹۸)، زیرا این آزمون‌ها به آسانی قابل اجرا بوده و نسبت به هزینه‌های مصرف‌شده، توانایی شناسایی چندین نوع باقیمانده آنتی‌بیوتیک با ساختارهای شیمیایی متفاوت را دارند. این عمل موجب کاهش تعداد نمونه‌های ارسالی برای آزمایش‌های تکمیلی می‌شود. ولی باید توجه داشت که این آزمون‌ها باید به‌نحوی تنظیم شوند که حداقل نتایج منفی کاذب را داشته باشند (کوری[2] و همکاران، ۱۹۹۸؛ دانگ[3] و همکاران، ۲۰۱۱).

در روش‌های میکروبی، مشاهده هاله عدم رشد بر غلظت باقیمانده‌های ضدمیکروبی در مواد غذایی مورد بررسی دلالت دارد. امروزه در اتحادیه اروپا، تست چهار پلیت به‌عنوان روش استاندارد جهت غربالگری نمونه‌های غذایی از نظر آلودگی به‌دسته‌های اصلی بقایای آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (کلینیک و کاکلی، ۲۰۰۸). در این روش که به‌عنوان یکی از روش‌های کیفی استاندارد جهت تعیین بقایای آنتی‌بیوتیکی محسوب می‌شود از دو باکتری باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس (یا میکروکوکوس لوتئوس) در محیط کشت مولر هینتون آگار با pHهای ۶، ۷/۲ و ۸ استفاده می‌گردد. به‌نحوی که، هر محیط کشت با میکروارگانیسم حساس و شاخص آن در pH مشخصی جهت تعیین چندین خانواده و یا خانواده خاصی از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی بهینه شده است (چانگ[4] و همکاران، ۲۰۰۰). بر اساس این روش، چنانچه قطر هاله عدم رشد بزرگتر و یا مساوی ۲ میلی‌متر باشد، آن نمونه مثبت قلمداد می‌گردد (تاجیک و همکاران، ۲۰۱۰).

نتایج فراوانی بقایای آنتی‌بیوتیکی با استفاده از تست چهار پلیت به تفکیک استان مبدا پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در جدول ۱ ارائه شده است. از تعداد ۲۴۰ نمونه فیله ماهی‌قزل‌آلا مورد بررسی بر اساس هاله عدم رشد در ۶ pH، ماهیان پرورشی در استان لرستان ۱۶ مورد (۲۰٪)، استان کرمانشاه ۱۳ مورد (۱۶/۲۵٪) و استان کردستان ۶ مورد (۷/۵٪) دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی یعنی قطر هاله عدم رشد برابر یا بیشتر از ۲ میلی‌متر بودند. در ۷/۲ pH، به ترتیب در ۱۲ مورد (۱۵٪)، ۱۱ مورد (۱۳/۷۵٪) و ۳ مورد (۳/۷۵٪) از ماهیان پرورشی استان‌های لرستان، کرمانشاه و کردستان دارای باقیمانده آنتی‌بیوتیکی بودند. در ۸ pH نمونه‌های ماهی استان لرستان، کرمانشاه و کردستان به

1. Okerman
2. Currie
3. Dang
4. Chang

ترتیب ۳۰ مورد (۳۷/۵٪)، ۱۹ مورد (۲۳/۷۵٪) و ۱۰ مورد (۱۲/۵٪) دارای باقیمانده آنتی‌بیوتیکی بودند. همچنین، در pH ۸s تنها ۱ نمونه (۱/۲۵٪) استان کرمانشاه و ۱ نمونه (۱/۲۵٪) استان لرستان دارای قطر هاله عدم رشد برابر یا بیشتر از ۲ میلی‌متر بودند. نتایج آنالیز آماری نشان داد که جداسازی بقایای آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های مختلف هر استان با بکارگیری محیط کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس در pH ۸ با سایر محیط‌های کشت بصورت معنی‌داری از لحاظ آماری متفاوت بود ($P < 0.05$). آنالیز آماری با استفاده از آزمون‌های Chi Square و Fisher's Exact Test نیز نشان داد که جداسازی بقایای آنتی‌بیوتیکی در ماهیان پرورشی استان‌های مختلف با بکارگیری pH ۸ با یکدیگر متفاوت بوده و از لحاظ آماری این تفاوت معنی‌دار است ($P < 0.05$). همچنین، بر اساس نتایج مطالعه حاضر، جداسازی بقایای آنتی‌بیوتیکی در ماهیان قزل‌آلا با مبدا پرورش استان کرمانشاه و لرستان در pHهای ۷/۲ و ۶ با استان کردستان تفاوت آماری معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$، جدول ۱). وقوع بقایای آنتی‌بیوتیکی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان جمع‌آوری شده بر اساس استان مبدأ پرورش در طی فصول مختلف در نمودار ۱ ارائه شده است. بر طبق یافته‌های این مطالعه، بیشترین میزان آلودگی نمونه‌ها در فصل زمستان و پاییز مشاهده گردید ($P < 0.05$). همچنین، در نمونه‌های با مبدأ پرورش استان کرمانشاه و کردستان در فصل تابستان هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نشد.

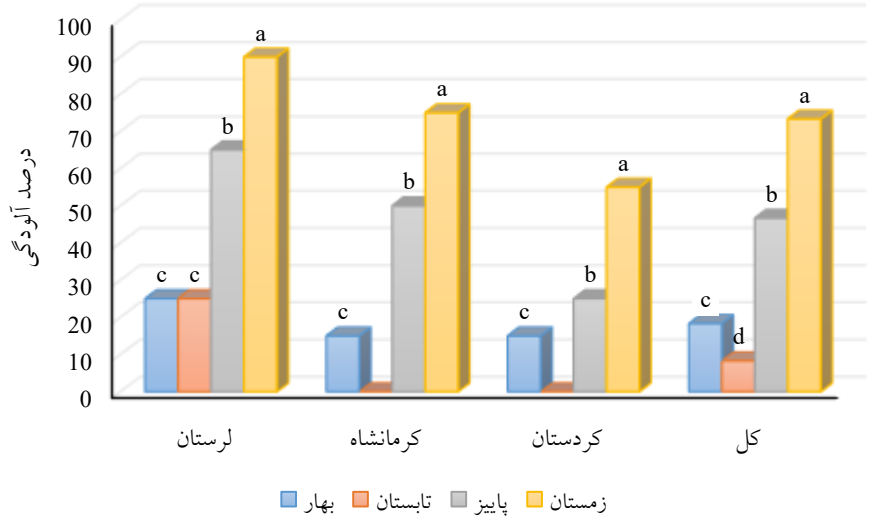
جدول ۱. تعداد نمونه‌های با قطر هاله عدم رشد متفاوت در تست چهارپلیت با توجه به نوع باکتری و pH محیط‌های کشت

هاله عدم رشد	استان لرستان				استان کرمانشاه				استان کردستان			
	pH ٦	pH ۷/۲	pH ۸	pH ۸s	pH ٦	pH ۷/۲	pH ۸	pH ۸s	pH ٦	pH ۷/۲	pH ۸	pH ۸s
۲ میلی‌متر ≥	۱٦^{bA}	۱۲^{bA}	۳۰^{aA}	۱^{c}	۱۳^{bA}	۱۱^{bA}	۱۹^{aB}	۱^{c}	٦^{bB}	۳^{bB}	۱۰^{aC}	–
۱–۲ میلی‌متر ≥	۲	۲	۲	۱	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۱	–
۱ میلی‌متر >	٦۲	٦٦	٤۸	۷۸	٦٥	٦۷	٥۹	۷۸	۷۳	۷٦	٦۹	۸۰
تعداد کل	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰

* محیط کشت در pH ۸s حاوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و در pH ۶، ۷/۲ و ۸ حاوی باکتری باسیلوس سوبتیلیس می‌باشد.

$^{a-c}$ مقادیر موجود در یک سطر مشابه با حروف نمایی کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین pHهای مختلف در هر استان مورد بررسی است ($P < 0.05$).

$^{A-B}$ مقادیر موجود در یک سطر مشابه با حروف نمایی بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین استان‌های مختلف است ($P < 0.05$).



نمودار۱. وقوع بقایای آنتی‌بیوتیکی در ماهیان قزل‌آلای جمع‌آوری‌شده بر اساس استان مبدأ پرورش در طی فصول مختلف.a-d مقادیر موجود با حروف نمایی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین فصول مختلف می‌باشد ($P < 0.05$).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند، تست چهار پلیت می‌تواند برای شناسایی طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها شامل آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها، لینکوزآمیدها، تتراسایکلین‌ها و کینولون‌ها مورد استفاده قرار گیرد. تغییرات pH محیط کشت بیشترین تأثیر را روی آشکارسازی اثر ممانعت‌کننده رشد باکتری‌ها توسط آنتی‌بیوتیک‌ها دارد، به‌طوری‌که تغییر محیط کشت در بعضی مواقع حساسیت را ده برابر و یا بیشتر خواهد نمود. برخی آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر خانواده تتراسایکلین‌ها (اکسی‌تتراسایکلین، تتراسایکلین و کلروتتراسایکلین) در pH ۶، خانواده سولفونامیدها در pH ۷/۲، خانواده فلوروکینولون‌ها نظیر انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در pH ۸ و دی‌فلوکساسین در pH ۷/۲، و فلورفنیکل در pH ۶ و pH ۷/۲ بیشترین تاثیر را بر رشد میکروارگانیسم هدف خواهند داشت (کوری و همکاران، ۱۹۹۸؛ دانگ و همکاران، ۲۰۱۱). بر این اساس، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، احتمالاً بیشترین آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در استان کرمانشاه، لرستان و کردستان مربوط به خانواده فلوروکینولون‌ها می‌باشد. علاوه بر pH محیط کشت، باکتری مورداستفاده نیز در تشخیص بهتر مؤثر است. همچنین، مشخص شده است که عوامل مختلفی مانند ماهیت بافت از نظر آزادسازی باقیمانده‌ها به داخل محیط کشت، وجود ترکیبات ضدمیکروبی بافتی مانند کمپلمان‌ها و همچنین نوع باکتری شاخص محیط کشت بر روی نتایج تست چهارپلیت تأثیرگذار هستند (کلینیک و کاکلی، ۲۰۰۸؛ اوکرمن و همکاران، ۱۹۹۸).

در برخی از مطالعات، از تست چهار پلیت برای غربالگری اولیه بقایای آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی با منشأ دامی استفاده شده است. برای مثال، در مطالعه شهبازی و همکاران (۲۰۱۵) وجود باقیمانده‌های دارویی با استفاده از روش چهار پلیت تست در بافت‌های مختلف مرغ (ران، سینه و کبد) بررسی و گزارش گردید ۲۵٪ از لاشه‌های مرغ حاوی باقیمانده‌های دارویی می‌باشند. در مطالعه تاجیک و همکاران (۲۰۱۰)، نتایج روش چهار پلیت تست نشان داد که ۱۷/۵٪ از نمونه‌های کبد، کلیه و گوشت مرغ به باقیمانده‌های دارویی آلوده بودند. در مطالعه کلینیک و

کاکلی، (۲۰۰۸) روش چهارپلیت به‌عنوان روش غربالگری مناسب برای احتمال وجود داروهای خانواده سولفونامیدها گزارش شده است.

در مطالعه جوادی و همکاران (۱۳۸۹)، تعداد ۱۸۰ نمونه پوست و ۱۸۰ نمونه گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از مراکز فروش ماهی در شهر تبریز تهیه شد. پس از انجام مراحل مختلف تست چهار پلیت، از مجموع ۱۸۰ نمونه پوست، ۱۳ مورد (۷/۲۲٪) و از مجموع ۱۸۰ نمونه گوشت ۱۸ مورد (۱۰٪) آلوده به بقایای آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی آلودگی دو بافت تحت مطالعه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و بیشترین مقدار بقایای آنتی‌بیوتیک مربوط به گروه‌های پنی‌سیلین و ماکرولیدها تعیین شد. در مطالعه‌ای با عنوان میزان حساسیت روش‌های جستجوی آنتی‌بیوتیکی روی چهار خانواده پنی‌سیلین، سفالوسپورین، تتراسایکلین‌ها و کینولون در بافت ماهی توسط اوکرمن و همکاران (۱۹۹۸)، نشان داده شد که بیشترین تعداد موارد مثبت آلودگی مربوط به پلیت حاوی باسیلوس سوبتیلیس در pH ۶ می‌باشد و احتمالاً تتراسایکلین‌ها بیشترین آنتی‌بیوتیک استفاده‌شده در پرورش ماهی قزل‌آلا بوده است. شهبازی و همکاران (۲۰۱۵)، بقایای آنتی‌بیوتیکی در ۱۲۰ نمونه تخم‌مرغ جمع‌آوری شده در شهر کرمانشاه را با استفاده از روش چهار پلیت تست ارزیابی و گزارش کردند ۳٪ از نمونه‌ها در محیط‌های کشت دارای pH ۶ (خانواده تتراسایکلین‌ها) و pH ۸ (خانواده آمینوگلیکوزیدها) مثبت بوده‌اند. در مطالعه احسانی و هاشمی[1] (۲۰۱۵)، تعداد ۲۰۰ نمونه تخم‌مرغ از نظر بقایای آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش چهارپلیت بررسی و گزارش شد که ۱۲/۵٪ آلودگی به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده ماکرولیدها داشته‌اند. با توجه به‌نتایج تست چهار پلیت در مطالعه حاضر، بیشترین آنتی‌بیوتیک‌های احتمالی موجود در نمونه‌های ماهی-قزل‌آلای جمع‌آوری‌شده مربوط به خانواده فلوروکینولون‌ها، تتراسایکلین‌ها، سولفونامیدها و فلورفنیکل می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات و همکاری‌های دستگاه اجرایی سفارش دهنده (اداره کل شیلات استان کرمانشاه) و ناظر محترم طرح جناب آقای مهندس مجتبی پوریا تشکر و قدردانی می‌گردد.

1. Ehsani & Hashemi

فهرست منابع

جوادی، افشین، میرزایی، حمید، میررضوی، فرزاد (۱۳۸۹). **مطالعه بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بازاری در تبریز**. مجله علمی شیلات ایران، ۱۹(۱)، ۱۶-۹.

Ahmadi, F., Shahbazi, Y., & Karami, N. (2015). **Determination of tetracyclines in meat using two phases freezing extraction method and HPLC-DAD**. *Food Analytical Methods, 8*(7)*,* 1883-1891.

Barani, A., & Fallah, A. A. (2015). **Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, fluoroquinolones and florfenicol in farmed rainbow trout in Iran**. *Food and Agricultural Immunology, 26*(3), 420-429.

Chang, C. S., Tai, T. F., & Li, H. P. (2000). **Evaluating the applicability of the modified four-plate test on the determination of antimicrobial agent residues in pork**. *Journal of Food and Drug Analysis*, *8*(1), 25-34.

Currie, D., Lynas, L., Kennedy, D. G., & McCaughey, W. J. (1998). **Evaluation of a modified EC Four Plate Method to detect antimicrobial drugs**. *Food Additives & Contaminants*, *15*(6), 651-660.

Dang, P. K., Degand, G., Douny, C., Ton, V. D., Maghuin-Rogister, G., & Scippo, M. L. (2011). **Optimisation of a new two-plate screening method for the detection of antibiotic residues in meat**. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*(10), 2070-2076.

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.**

Fadaeifard, F. (2012). **Determination of fluoroquinolones residue in the muscle and liver of cultured rainbow trout in Chaharmahal-va-Bakhtiari province by ELISA**. *Journal of Food Hygiene, 2,* 53–63.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). **Modern food microbiology 7th.** Springer Science Business Media. 1-345.

Kilinc, B., & Cakli, S. (2008). **Screening for antibiotic residues in the trout by the Four Plate test, Premi test and ELISA test**. *European Food Research and Technology*, *226*(4), 795-799.

Khan-Nazer, A. H., & Kahba, H. (1999). **Detection of antibiotic residues in the carcases of poultry by four plate test method and the boiling effect on them**. *Animal Science Journal*, *43*, 62-65.

Koenen-Dierick, K., Okerman, L., De Zutter, L., Degroodt, J. M., Van Hoof, J., & Srebrnik, S. (1995). **A one-plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: An alternative to the EEC four-plate method**? *Food Additives & Contaminants*, *12*(1), 77-82.

Okerman, L., De Wasch, K., & Van Hoof, J. (1998). **Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix**. *Analyst*, *123*(11), 2361-2365.

Okerman, L., Hoof, J. V., & Debeuckelaere, W. (1998). **Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets**. *Journal of AOAC International*, *81*(1), 51-56.

Pikkemaat, M. G. (2009). **Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *395*(4), 893-905.

Rahimi, Z., Shahbazi, Y., & Ahmadi, F. (2018). **Comparative screening of chloramphenicol residue in chicken tissues using Four Plate Test and Premi®Test method**s. *Pharmaceutical Sciences*, *24*(2), 157-162.

Shahbazi, Y., Hashemi, M., Afshari, A., & Karami, N. (2015). **A survey of antibiotic residues in commercial eggs in Kermanshah, Iran**. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, *7*(2), 57-62.

Shalaby, A. R., Salama, N. A., Abou-Raya, S. H., Emam, W. H., & Mehaya, F. M. (2011). **Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver**. *Food Chemistry, 124*(4), 1660-1666.

Swapna, K. M., Rajesh, R. R., & Lakshmanan, P. T. (2012). **Incidence of antibiotic residues in farmed shrimps from the southern states of India**. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 41,* 344–347.

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.