

# استفاده از روش F.P.T. جهت تعیین باقیمانده آنتی بیوتیک در لاشه گوسفند

دکتر عبدالله حسین خان ناظر - دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز  
دکتر شهرام شکر فروش - مربی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز  
دکتر کریم قانع - دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (سال تحقیق ۱۳۷۲)

شکل ۱ -  
نمونه گیری  
و آماده سازی  
نمونه ها از  
لاشه



## مقدمه

در لاشه دامهای ذبح شده و انتقال آن به بدن مصرف کنندگان یکی از این اثرات زیان بخش می باشد. مصرف محصولات دامی آلوده به آنتی بیوتیک در بیشتر مواقع عوارضی شبیه به مصرف مستقیم آنتی بیوتیک در انسان ایجاد می کند. از جمله این عوارض می توان واکنشهای ازدیاد حساسیت یا آلرژی نظیر کهیر، خارش، بشورات جلدی، تهوع، استفراغ و شوک آنافیلاکسی (۲، ۴، ۱۱، ۱۵) و تغییر فلور میکروبی دستگاه گوارش و ایجاد زمینه مناسب جهت رشد و فعالیت میکروبیهای بیماریزا (۱۶)، اختلالات متابولیسمی و کم خونی (۳ و ۱۶)، مسمومیت (۱۶)، اختلالاتی در جنین انسان از جمله اختلالات شنوایی، دندانی و یرقان (۱) و ایجاد مقاومت قابل انتقال در باکتریهای بیماریزا و غیر بیماریزای موجود در دستگاه گوارش انسان (۵، ۹ و ۱۲) را نام برد.

با توجه به این که مهمترین منبع تأمین پروتئین مورد نیاز بشر گوشت می باشد و نظر به رشد روزافزون جمعیت و محدودیت ظرفیت مراتع و مزارع در تولید علوفه و غذای دامها، دانشمندان و محققان همواره درصدد دستیابی به روشهایی جهت افزایش راندمان تولید دامها می باشند و در این راستا امروزه از آنتی بیوتیکها در سطح وسیعی جهت درمان و کنترل بیماریها و همچنین به عنوان محرک رشد دامها استفاده می شود.

علیرغم اثرات مفید آنتی بیوتیکها، اثرات سوء آنها نیز ممکن است باعث ایجاد عوارض زیانباری در دامها و انسان گردد. وجود باقیمانده آنتی بیوتیکی

نظر به اینکه باقیمانده آنتی بیوتیکها در مواد غذایی مختلف اثرات زیان بخشی در مصرف کنندگان ایجاد می کند، کنترل کیفی کلیه فرآورده های غذایی از نظر عاری بودن از آنتی بیوتیکها، امری لازم و ضروری است. از متداولترین و کاربردی ترین روشهای تعیین باقیمانده آنتی بیوتیکها در مواد غذایی، روشهای میکروبیولوژیکی را می توان نام برد. روش F.P.T. (Four plate test) از جمله روشهای میکروبیولوژیکی است که در سالهای اخیر توسط بعضی از محققین مورد استفاده قرار گرفته و حساسیت آن جهت تشخیص باقیمانده آنتی بیوتیکها مورد تأیید قرار گرفته است.

به منظور تعیین باقیمانده آنتی بیوتیکها در لاشه گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه اضطراری مجتمع صنعتی گوشت فارس، ۲۰۰ رأس از گوسفندانی که به دلیل داشتن بیماریهای مختلف در کشتارگاه مذکور ذبح گردیده و لاشه آنها قابل مصرف تشخیص داده شده بود، به طور تصادفی انتخاب و از عضلات دست و پا، دیافراگم و کلیه آنها نمونه برداری گردید.

نمونه های مذکور پس از آماده سازی، با روش F.P.T. مورد آزمایش قرار گرفتند.

۵۷/۵ درصد از نمونه های کلیه، ۶۰/۵ درصد عضلات دیافراگم، ۵۶/۰ درصد عضلات دست و ۵۲/۰ درصد عضلات ران دارای باقیمانده آنتی بیوتیکی بودند.

۱۵۶ رأس (۷۸/۰ درصد) از گوسفندان مورد بررسی حداقل در یک اندام آلوده به آنتی بیوتیک تشخیص داده شدند و در ۸۷ مورد (۴۳/۵ درصد) همه اندامهای مورد آزمایش دارای باقیمانده آنتی بیوتیکی بودند.

تحقیق حاضر مبین این موضوع است که کارآیی روش F.P.T. در تشخیص باقیمانده آنتی بیوتیکها در گوشت بیش از دو و نیم برابر روشهای معمول میکروبیولوژیکی است و جایگزین نمودن این روش به جای روشهای معمول، در کلیه آزمایشگاههای کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی پیشنهاد می گردد.

شده است.

### ب - نمونه‌گیری و آماده‌سازی نمونه‌ها

در تابستان سال ۱۳۷۲ ضمن مراجعه مکرر به کشتارگاه اضطراری مجتمع صنعتی گوشت فارس، ۲۰۰ رأس گوسفند ذبح شده در آن کشتارگاه که به وسیله تکسین بازرسی گوشت مربوطه، لاشه آنها قابل مصرف تشخیص داده شده بود، به طور تصادفی انتخاب و از شش محل مختلف لاشه و احشاء آنها نمونه‌گیری شد. نمونه‌های مورد نظر به مقدار ۱-۲ گرم، از کلیه، عضله دیافراگم، عضله سمی ممبرانوس راست و چپ و عضله براکیوسفالیکوس راست و چپ تهیه شدند. شیرابه نمونه‌های مذکور به طور خالص (بدون

امروزه جهت تعیین باقیمانده آنتی‌بیوتیکها در مواد غذایی از روشهای مختلف کمی و کیفی از جمله اسپکتروفتومتری، کروماتوگرافی، الکتروفورز و میکروبیولوژی استفاده می‌شود. روشهای میکروبیولوژی عمدتاً کیفی بوده و با توجه به دامنه عمل وسیع و کارایی مناسب، ارزان بودن، ساده بودن امکانات مورد نیاز و اصولاً عدم نیاز آزمایشگاههای کنترل کیفی مواد غذایی به بررسی کمی باقیمانده آنتی‌بیوتیکها در مواد غذایی، در سطح وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷).

در این رابطه روش F.P.T. (Four plate test) از جمله روشهای میکروبیولوژی است که در سالهای اخیر توسط بعضی از محققین مورد استفاده قرار گرفته و حساسیت آن جهت تشخیص آنتی‌بیوتیکهای مختلف ذخیره شده در مواد غذایی مورد تأیید قرار گرفته است (۷، ۱۳، ۱۴).

در این روش نمونه‌های مواد غذایی بر روی چهار پلیت حاوی محیط کشت با pHهای ۶، ۷/۲ و ۸ برده می‌شوند، و از دو باکتری *Micrococcus latus* و *Bacillus subtilis* استفاده می‌گردد (۷، ۱۳ و ۱۴).

تحقیق حاضر به منظور تعیین باقیمانده آنتی‌بیوتیکی در لاشه گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه اضطراری مجتمع صنعتی گوشت فارس و همچنین ارزیابی روش F.P.T. در مقایسه با روشهای معمول باکتریولوژی در تشخیص باقیمانده آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی انجام شده است.

### روش کار

**الف - انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی روی باکتریهای مورد استفاده در تحقیق** به منظور تعیین میزان حساسیت دو باکتری *M. latus* و *B. subtilis* به هفت نوع

آنتی‌بیوتیک رایج در درمان گوسفند و تعیین کمترین رقت دارو که مانع از رشد باکتری می‌گردد (Minimal inhibitory concentration) از رقتهای متوالی Chloramphenicol، Gentamycin، Oxyteracyclin، Streptomycin، Penicillin، Lincospectin و محیط کشت آنتی‌بیوتیک آگار Oxoid CM327 (Antibiotic medium agar) با pHهای ۶، ۷/۲ و ۸ استفاده گردید. توضیحاً این که pH محیطهای کشت قبل از استریل شدن با استفاده از pH متر مجهز به دماسنج، با اسیدکلریدریک و یا هیدروکسید سدیم رقیق تنظیم می‌گردید.

حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شده بر حسب g/ml و مقایسه آن با حداکثر مقدار مجاز آنتی‌بیوتیک در گوشت (۷) در جدول شماره یک آورده

آنها چکانده و جهت نفوذ شیرابه به داخل محیط کشت (Prediffusion time)، مدت دو ساعت آنها را در دمای اتاق نگهداشته سپس پلیتها را با توجه به نوع باکتری کشت شده به گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد یا ۳۰ درجه سانتیگراد منتقل نموده و ۲۴ ساعت بعد، نتایج تستهای مثبت بر اساس تشکیل هاله‌های شفاف (Inhibition zone) در محل چکانیدن شیرابه‌ها ثبت می‌گردید.

### نتایج

در این تحقیق جمعاً از لاشه ۲۰۰ رأس گوسفند مورد بررسی ۱۲۰۰ نمونه تهیه گردید. هر نمونه پس از آماده‌سازی در چهار شرایط مختلف که از نظر pH محیط کشت و باکتری مورد استفاده متفاوت بودند، مورد آزمایش قرار گرفتند. همان طور که در جدول شماره ۲ ملاحظه می‌گردد، از ۲۰۰ لاشه مورد آزمایش ۱۵۶ لاشه (۷۸/۰ درصد) دارای آلودگی آنتی‌بیوتیکی حداقل در یک عضو و در ۸۷ لاشه (۴۳/۵ درصد) همه اندامهای مورد آزمایش دارای باقیمانده آنتی‌بیوتیکی بودند. ۴۴ لاشه (۲۲/۰ درصد) عاری از آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شدند (جدول شماره ۲).

در مجموع از ۲۰۰ نمونه کلیه مورد آزمایش ۱۱۵ مورد (۵۷/۵ درصد) و از ۲۰۰ نمونه عضله دیافراگم مورد آزمایش ۱۲۱ مورد (۶۰/۵ درصد) و از ۴۰۰ نمونه عضله براکیوسفالیکوس راست و چپ ۲۲۴ مورد (۵۶/۰ درصد) و از ۴۰۰ نمونه عضله سمی ممبرانوس راست و چپ ۲۰۸ مورد (۵۲/۰ درصد) مثبت تشخیص داده شدند (جدول ۳).

### بحث

جهت تشخیص باقیمانده آنتی‌بیوتیکها در مواد غذایی از روشهای مختلف کمی و کیفی استفاده می‌شود که هر یک توانایی، معایب و محاسن خاص خود را داراست.

از متداولترین روشهای تشخیص کیفی، آزمایشات میکروبیولوژی را می‌توان نام برد.

متدهای مختلف تشخیص آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی با استفاده از آزمایشات باکتریولوژی تدوین و ارائه شده‌اند که همگی بر یک اصل استوار می‌باشند و آن تشخیص وجود آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی از طریق ایجاد هاله شفاف بر روی پلیت می‌باشد. ولی اختلافاتی در نوع محیط کشت و pH آن، نوع باکتری مورد استفاده در آزمایش و افزودن ترکیباتی به عنوان سینرژیست (Synergistic compounds) به محیط

افزودن سرم فیزیولوژی نمکی به آنها) تهیه شده و جهت غیرفعال کردن کمپلمان موجود در آنها و حذف عوامل ضد میکروبی طبیعی بدن، شیرابه‌های به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۵۸ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

### ح - بررسی وجود یا عدم وجود باقیمانده آنتی‌بیوتیکی در شیرابه‌های تهیه شده

در این مرحله محیط کشت آنتی‌بیوتیک آگار با سه pH مختلف تهیه و پس از کشت دادن باکتریهای مورد نظر روی آنها (باکتری *B. Subtilis* روی محیطهای با pH ۶، ۷/۲ و ۸ و باکتری *M. latus* روی محیط با pH-۸، صدمیکرولیتر از شیرابه‌های تهیه شده را روی



کشت وجود دارد (۲، ۸، ۱۴).

تغییرات pH محیط کشت بیشترین تأثیر را بر روی آشکارسازی اثرات ممانعت کننده از رشد باکتریها توسط آنتی‌بیوتیکها دارد. بعضی از آنتی‌بیوتیکها مثل Bacitracin و Tetracycline در محیطهای اسیدی بهترین فعالیت را دارند و بعضی دیگر از جمله Streptomycin، Neomycin، Polymixin B و Erythromycine در محیطهای قلیایی بیشترین تأثیر را خواهند داشت. تغییر pH محیط کشت در بعضی مواقع حساسیت را ده برابر یا بیشتر خواهد نمود (۸ و ۱۴). همچنین افزودن Trymethoprim به محیط کشت حساسیت آزمایش جهت تشخیص Sulfonamid را ۲۰ تا ۵۰ برابر بیشتر می‌کند (۶). علاوه بر pH محیط کشت، باکتری مورد استفاده نیز در تشخیص بهتر بسیار مؤثر می‌باشد. بر اساس تحقیقات انجام شده، *M. latus* بیش از بقیه باکتریها به آنتی‌بیوتیکهای خانواده حساس بوده و با استفاده از آن، این دسته از آنتی‌بیوتیکها بهتر تشخیص داده می‌شوند (۱۳).

با توجه به نتایج حاصل از تحقیقات محققین مختلف هیچ یک از متدهای مختلف تشخیص آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی به تنهایی قادر به تشخیص همه انواع آنتی‌بیوتیکها نیستند. لذا توصیه شده است که برای تشخیص آنتی‌بیوتیکها از محیطهای کشت با pHهای مختلف و سوبه‌های مناسب با کتریایی استفاده شود (۸). در این رابطه محققینی که از روش F.P.T. استفاده نموده‌اند، مشخص کرده‌اند که این روش حساسیت لازم جهت تشخیص آنتی‌بیوتیکهای مختلف ذخیره شده در مواد غذایی را دارا می‌باشد (۷، ۱۳ و ۱۴).

جدول شماره ۳ نشانگر این موضوع است که هر یک از چهار شرایط مختلف آزمایش به تنهایی ۲۹/۲، ۲۴/۳، ۳۰/۱ و ۳۱/۲ درصد نمونه‌های مورد آزمایش را آلوده به آنتی‌بیوتیک تشخیص داده‌اند، ولی ۷۸/۵ درصد دامهای مورد بررسی در مجموع چهار شرایط مختلف، آلوده به آنتی‌بیوتیک بوده‌اند. نتایج حاصل از این تحقیق مبین این موضوع است که کارایی روش F.P.T. در مقایسه با روشهای معمول میکروبیولوژی که فقط از یک محیط کشت و یک سوبه با کتریایی استفاده می‌شود، بیش از دو و نیم برابر است.

همان طور که در جدول شماره یک ملاحظه می‌شود، حداقل غلظت آنتی‌بیوتیکهای تشخیص داده شده توسط آزمایش مورد استفاده در این تحقیق، در تمام موارد معادل و یا بیشتر از حداکثر مقدار مجاز آنها در گوشت بوده است، لذا کلیه نمونه‌هایی که در این بررسی آلوده به آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شده‌اند، مقدار باقیمانده آنتی‌بیوتیک موجود در آنها بیش از حداکثر مجاز بوده و برای مصرف کننده مضر می‌باشند. از مجموع ۱۵۶ (۷۸/۵ درصد) لاشه‌ای که آلوده به باقیمانده آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شدند، در ۸۷ لاشه (۴۳/۵ درصد) کلیه اندامهای مورد بررسی دارای باقیمانده آنتی‌بیوتیکی بودند و این موضوع مبین انتشار سیستمیک آنتی‌بیوتیک در آن لاشه‌ها بوده و بر اساس استانداردهای موجود می‌بایست معدوم می‌شدند. همچنین ۶۹ لاشه (۳۴/۵ درصد) دیگر نیز با توجه به

اندامی که دارای آلودگی بوده است، می‌بایست به طور موضعی اصلاح می‌گردیدند (۷).

هر چند که وجود باقیمانده آنتی‌بیوتیکی در درصد بالایی از گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه اضطراری را نمی‌توان به گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه عادی تعمیم داد، ولی با توجه به تعداد دامهای بیماری که روزانه در کشتارگاههای کشور ذبح می‌شوند و با توجه به مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در آنها، لزوم به کارگیری تدابیری جهت جلوگیری از ذبح دامهایی که دوره دفع دارو (Withdrawal time) را نگذرانیده‌اند و

نظر داشتن باقیمانده آنتی‌بیوتیکی.

۴- نمونه‌گیری و آزمایش لاشه و احشاء درصدی از دامهای گله‌های ارجاعی به کشتارگاهها و همچنین لاشه‌ها و گوشت‌های وارداتی، از نظر داشتن باقیمانده آنتی‌بیوتیکی.

۵- انجام یک تحقیق مشابه بر روی لاشه و احشاء طیور ارجاع شده به کشتارگاههای طیور کشور.

### سیاسگذاری

بدینوسیله از شورای محترم تحقیقات دانشکده



شکل ۳-  
چکاندن شیرابه  
تهیه شده  
بر روی  
محیط کشت  
آنتی‌بیوتیک  
آگار

دامپزشکی شیراز به خاطر تأمین هزینه‌های این پروژه و از مدیریت محترم مجتمع صنعتی گوشت فارس که نهایت همکاری را مبذول داشته‌اند قدردانی می‌گردد.

### منابع مورد استفاده

- ۱- صابری، م، ۱۳۶۶، فرهنگ دارویی. چاپ چهارم، انتشارات سروش، صفحه ۵۵۹.
2. Allison, J.R.D., 1985, Antibiotics residue in milk. British Vet. J. 141 (1): 9-16.
3. Barler, B.M. and Prescott, T., 1973, Antimicrobial agents in medicine, first ed., pp: 9-10. 25-26.
4. Frobisher, H.C. and Goodheart, H., 1974, Fundamentals of microbiology. 9th ed., W.B.

### پیشنهادات

- ۱- جایگزین نمودن روش F.P.T. به جای روشهای معمول میکروبیولوژی در آزمایشگاههای کنترل بهداشتی مواد غذایی.
- ۲- جلوگیری از کشتار دامها در خارج از کشتارگاههای مجاز و همچنین جلوگیری از ذبح دامهایی که به آنها دارو تجویز شده است ولی دوره دفع دارو را نگذرانیده‌اند.
- ۳- نمونه‌گیری و آزمایش لاشه و احشاء کلیه دامهای بیمار و مشکوک ارجاع شده به کشتارگاهها، از

جدول شماره ۱: حداقل غلظت آنتی بیوتیک تشخیص داده شده در چهار شرایط مختلف بر حسب  $\mu\text{g/ml}$  و مقایسه آن با حداکثر مقدار مجاز آنتی بیوتیک در گوشت (۷).

حد اکثر مقدار مجاز آنتی بیوتیک در گوشت $\mu\text{g/g}$	۸ M.L.	۸ B.S.	۷/۲ B.S.	۶ B.S.	pH محیط کشت نوع باکتری
۰/۰۱	۸	۵۱۲	۲۵۶	۲۵۶	Chloramphenicol
۴	۴	۴	۴	۱	Gentamycin
۰/۲۵	۴	۱۲۸	۳۲	۱	Oxytetracycline
۰/۰۶	۴	۴	۲۵۶	۱	Penicillin
۱/۰۰	۱	۴	۴	۱	Streptomycine
۰/۲۰	۴	۴	۲	۱	Tylosine
۰/۵ و ۰/۲۰	۴	۱۲۸	۶۴	۱	Lincospectin

B.S. = *Bacillus subtilis*

M.L. = *Micrococcus latus*

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از آزمایش F.P.T. در ۲۰۰ لاشه مورد آزمایش

لاشه های دارای باقیمانده آنتی بیوتیک	نام اندام
۱/۰	کلیه
۳/۵	دیافراگم
۷/۵	عضلات دست یا پا
۹/۰	کلیه + عضلات دست یا پا
۴/۰	کلیه + دیافراگم
۹/۵	دیافراگم + عضلات دست یا پا
۸۷	همه اندامهای مورد آزمایش
۷۸/۰	جمع

جدول شماره ۳: نتایج حاصل از انجام آزمایش F.P.T. در اندامهای مختلف با توجه به نوع باکتری و pH های مختلف محیط کشت.

جمع*	موارد مثبت، تعداد و (درصد)				تعداد نمونه	اندام
	۸ M.L.	۸ B.S.	۷/۲ B.S.	۶ B.S.		
۱۱۵	۶۸	۴۸	۵۶	۲۰۰	کلیه	
(۵۷/۵)	(۳۴/۰)	(۲۴/۰)	(۲۸/۰)			
۱۲۱	۵۸	۴۹	۵۴	۲۰۰	دیافراگم	
(۶۰/۵)	(۲۹/۵)	(۲۴/۵)	(۲۷/۰)			
۲۲۴	۱۱۴	۹۷	۱۲۴	۴۰۰	عضله بر اکیوسفالیکوس	
(۵۶/۰)	(۳۰/۳)	(۲۴/۲)	(۳۱/۰)			
۲۰۸	۱۱۹	۹۷	۱۱۷	۴۰۰	عضله سعی ممبرانوس	
(۵۲/۰)	(۲۹/۷)	(۲۴/۲)	(۲۹/۰)			
	۳۷۴	۲۹۱	۳۵۱	۱۲۰۰	جمع	
	(۳۱/۲)	(۲۴/۳)	(۲۹/۲)			

\* موارد مثبت مشترک در آزمایشات چهارگانه، فقط یک بار محاسبه شده اند.

B.S. = *Bacillus subtilis*

M.L. = *Micrococcus latus*

Saunders Company, pp: 324-326.

5. Garside, J.S. and Gardon, R.F., 1960, The emergence of resistant strains of *Salmonella typhimurium* in tissue and alimentary tract of chickens following the feeding of antibiotic. Res. Vet. Sci. 1: 184-199.

6. Gouding, R., 1976, An improved bacteriological method for the detection of sulfanamide residues in food. Acta vet. Scand. 17:458-464.

7. Gracey, J.F. and Collins, D.S., 1992, Meat hygiene. 9th ed., Baillier Tindal, pp: 209-215.

8. Hannu, K., Olli, S., Desmo, M.P. and Jorma, 1982. Comparison of different agar diffusion methods for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals. Acta Vet. Scand.23: 407-415.

9. Kanai, H., 1983. Drug resistance and distribution of conjugative R-Plasmid in *Escherichia coli* strains isolated from healthy adult animals and humans. H. Vet. Sci., 45(2): 17-178.

10. O., Brien, J.J., Campbell, N. and Conaghan, T., 1981, Antibiotic residues in meat effects of cooking and cold storage on biologically active. Vet. Rec. 106 (16): 365.

11. Rooss, F.C., 1986, Introductory microbiology. 2th ed. Delta college, University of Michigan, pp: 233-242.

12. Smith, H.W. and Halls, S., 1967, The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls hemolysin production. J. Jen. Mic. 47: 153-161.

13. Smither, R., Lott, A.F., Dalziel, R.W. and Ostkr, K.C., 1980, Antibiotic residues in meat in the United Kingdom, an assessment of specific test to detect and identify antibiotic residues. J. Hyg. Lon. 85 (3): 359-362.

14. Stephan, F. and Ake, R., 1979, Modified method for the detection of antibiotic residues in slaughter animals. Acta vet. Scand. 20: 477-491.

15. Van, H. and Gainer, J.H., 1978, Public health, concerns relative to the use of subtherapeutic levels of antibiotics in animal feeds. J. of animal Sci. 46(5): 1413-1424.

16. Walton, J.R., 1981, problems of medicinal residues in animal products. University of liverpool, Hare sign W.Rec. advances in animal nutrition, pp: 145-151.