



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

ارزیابی بقایای آنتی‌بیوتیکی در شیر خام تولیدی استان فارس با روش سریع در سال ۱۳۹۷ و تعیین مقدار اکسی‌تتراسایکلین، انروفلوکساسین و پنی‌سیلین جی در نمونه‌های آلوده

مجید هاشمی^{۱*}، محمد جواد آگاه^۲، امیر محمود رستگار^۳

- ۱- شعبه شیراز، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
- ۲- بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
- ۳- بخش آموزش و پژوهش، اداره کل دامپزشکی استان فارس، سازمان دامپزشکی، شیراز، ایران

چکیده

زمینه و هدف: توجه به بقایای آنتی‌بیوتیکی در شیر بدلیل اثرات بهداشتی در بروز مقاومت‌های میکروبی در مصرف‌کننده و همچنین اثرات مخرب در صنایع لبنی دارای اهمیت است. این بررسی با هدف تعیین مقدار اکسی‌تتراسایکلین، انروفلوکساسین و پنی‌سیلین جی در نمونه‌های شیر خام تولیدی استان فارس که در غربالگری با کیت سریع آلوده تشخیص داده شدند، انجام شد. **روش بررسی:** نمونه‌های اخذ شده ابتدا با کیت تجاری کیفی از نظر وجود باقیمانده آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفته و سپس مقدار آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین، انروفلوکساسین و پنی‌سیلین جی در نمونه‌های مثبت شده در آزمون سریع متعلق به ماه میانی هر فصل، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع به همراه طیف‌سنجی جرمی متوالی تعیین گردید. **یافته‌ها:** با کیت تجاری اکلیسی، ۱۲۱ (۷/۷ درصد) نمونه آلوده به آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شدند. فصل (P<۰/۰۰۱) و محل نمونه‌گیری (P<۰/۰۱) اثر معنی‌داری بر روی بقایای آنتی‌بیوتیکی در شیر خام استان داشتند. در روش کروماتوگرافی از ۶ نمونه (۲۷/۳ درصد) بقایای آنتی‌بیوتیکی اکسی‌تتراسایکلین و انروفلوکساسین جدا شد که غلظت هیچ کدام از آنها بیش از حد مجاز تعیین شده توسط سازمان دامپزشکی ایران نبود. **نتیجه‌گیری:** اگرچه مقادیر آنتی‌بیوتیک‌های جدا شده از شیر خام استان فارس بسیار پایین‌تر از حد مجاز بود، اما بدلیل احتمال وجود سایر مواد ضد میکروبی، لازم است تا اقدامات اجرایی و آموزشی و پژوهشی بیشتری برای به حداقل رساندن این بقایا در شیر خام صورت گیرد.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۶
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۲
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱

واژگان کلیدی: بقایای آنتی‌بیوتیکی، شیر خام، بیشینه حد مجاز، غربالگری، کروماتوگرافی مایع- طیف‌سنج جرمی متوالی

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

majid48h@yahoo.com

mj.hashemi@areeo.ac.ir

Please cite this article as: Hashemi M, Agah MJ, Rastegar AM. Evaluation of antibiotic residues in raw milk of Fars province by rapid method in 2018 and determining the amount of oxytetracycline, enrofloxacin and penicillin G in contaminated samples. Iranian Journal of Health and Environment. 2024;17(1):59-70.

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده‌ای در دامداری‌ها برای درمان و پیشگیری از بیماری‌ها و همچنین به صورت مکمل غذایی برای افزایش رشد مورد استفاده قرار می‌گیرند. طبق آمار سال ۲۰۲۰ میزان مصرف آنتی‌بیوتیک در ایران 145 mg/kg وزن بدن دام بوده است و ایران جزو کشورهای پر مصرف در این مقوله محسوب می‌شود. این در حالی است که سقف پیشنهادی جهانی برای مصرف آنتی‌بیوتیک در دام در سال ۲۰۲۰، 50 mg/kg وزن بدن دام بوده است (۱). مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها در دام می‌تواند عوارض مختلفی داشته باشد و وجود بقایای آنتی‌بیوتیکی در شیر خام می‌تواند از منظرهای مختلف مورد توجه قرار گیرد. از منظر بهداشتی، انتقال این بقایا به مصرف‌کننده انسانی، سبب ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده که علاوه بر خطرات بهداشتی، از نظر اقتصادی هم بدلیل افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و هزینه‌های درمانی قابل توجه هستند. همچنین اختلال در عملکرد میکروفلورهای طبیعی دستگاه گوارش، اثرات سرطان‌زایی و جهش‌زایی در انسان و جلوگیری از سنتز برخی ویتامین‌ها از دیگر مخاطرات وجود بقایای آنتی‌بیوتیکی در غذای انسان است. جلوگیری از فعالیت میکروارگانیسم‌های آغازگر (Starter) و مهار باکتری‌های مولد اسید لاکتیک از اثرات مخرب حضور بقایای آنتی‌بیوتیکی در صنایع لبنی و اختلال در تولید فرآورده‌های لبنی تخمیری است (۲). مصرف بی‌رویه این داروها در مراکز پرورش دام، طیور و آبزیان می‌تواند از طریق فاضلاب، به محیط زیست و اکوسیستم‌های آبی وارد شده و نهایتاً وارد بدن انسان گردد. برآورد شده در پساب خروجی فاضلاب شهر بندرعباس بین $13/2 - 2/5 \text{ } \mu\text{g/kg}$ بقایای آنتی‌بیوتیکی اریترومايسين وجود دارد (۳). امروزه خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی از حیوان به انسان و بالعکس از طریق باکتری‌های مختلف که بعضاً مشترک بین انسان و حیوان هستند، در درمان‌های دارویی اهمیت زیادی پیدا کرده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها می‌تواند به عنوان تهدیدی برای بهداشت عمومی جامعه مد نظر قرار گیرد. این مسئله می‌تواند علاوه بر عدم کارآئی مناسب دارو، باعث تحمیل هزینه‌های بیهوده گردد. در بررسی شیوع

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین عوامل باکتریایی ورم پستان گاو در استان فارس مشخص شد که این عوامل به شدت به پنی‌سیلین (۷۲ درصد) و آمپی‌سیلین (۳۸/۵ درصد) مقاومت داشتند (۴).

با توجه به اهمیت کنترل کیفی و بهداشتی شیر از نظر باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها، آزمون‌های مختلفی برای این مهم ارائه شده‌اند که به دو دسته روش‌های غربالگری که بر اساس مهار رشد میکروب‌ها و یا ایمنی‌سنجی هستند و روش‌های تأییدی که با استفاده از کروماتوگرافی و طیف‌سنجی هستند، تقسیم می‌شوند. غربالگری بقایای آنتی‌بیوتیکی با روش مهار میکروبی، اگرچه ساده، کم هزینه و دارای حساسیت بالا هست اما معایبی همچون ویژگی پایین (عدم توانایی تشخیص نوع آنتی‌بیوتیک یا تفریق از سایر مهارکننده‌های میکروبی) و زمان گرمخانه‌گذاری زیاد را داراست. در حال حاضر کیت‌های تجاری مختلفی بر اساس روش میکروبی توسط شرکت‌های مختلف طراحی شدند که بکارگیری آن نیاز به تبحر خاصی نداشته و بدلیل سادگی و کم هزینه بودن، استفاده گسترده‌ای در مراکز تولیدی و نظارتی دارند (۵). روش‌های کروماتوگرافی نیز اگرچه بدلیل نیاز به تجهیزات گران‌قیمت و عدم قابلیت اجرا در محل گاوداری، بیشتر با هدف تأیید نتایج روش‌های فوق استفاده می‌شوند، اما قابلیت بکارگیری در مطالعات غربالگری را نیز دارند و می‌توانند تعداد زیادی از داروهای دامپزشکی را پوشش دهند (۶). روش کروماتوگرافی مایع همراه با طیف‌سنج جرمی متوالی (LC-MS/MS) روشی با دقت، صحت، حساسیت و ویژگی رضایت‌بخش است و با آماده‌سازی نمونه آسان، کم هزینه و بدون اتلاف حلال، زمان پاسخ دهی توسط آزمایشگاه را سریع می‌نماید. جستجوی همزمان چندین آنتی‌بیوتیک و متابولیت‌های آنها از دیگر مزایای این روش است و حد تشخیص و جداسازی کافی برای تشخیص مقدار آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر در مقادیر تعیین شده توسط قوانین اتحادیه اروپا که بسیار سختگیرانه است را دارد (۷).

استان فارس با داشتن بیش از ۹۶ هزار رأس گاو و تولید حدود ۵۴۸ میلیون لیتر شیر خام در سال، رتبه اول تولید شیر در جنوب کشور را دارا است (۸)، اما تاکنون تحقیق جامع

pH است. زمانی که پلیت در 65°C (در یک انکوباتور یا حمام آب) قرار می‌گیرد، اسپورها رویش یافته و رشد می‌کنند. این عمل سبب کاهش pH محیط شده و رنگ اولیه از آبی ارغوانی به سبز متمایل به زرد تبدیل می‌شود. اگر نمونه‌های شیر حاوی غلظت بالاتر از حد جداسازی کیت باشند، رشد میکروبی و تولید اسید مهار شده و هیچ تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود. حد جداسازی این کیت برای چند مهار کننده در شیر گاو در جدول ۱ ارائه شده است. نمونه‌های مثبت در ماه میانی هر فصل (به ترتیب ۶، ۳، ۶ و ۷ نمونه در اردیبهشت، مرداد، آبان و بهمن) به منظور تعیین نوع و مقدار آنتی‌بیوتیک به آزمایشگاه ارسال شدند. قبل از تزریق نمونه به دستگاه ابتدا نمونه‌ها با روش توصیه شده توسط Jang و همکاران (۲۰۱۵) به منظور رسوب پروتئین و چربی‌زدایی آماده‌سازی شدند (۹). شیر خام به مقدار ۱۰ mL در فالکن ریخته شده و ۱۰ mL استونیتریل به آن اضافه شد. سپس برای رسوب کامل پروتئین‌های شیر، با استفاده از ورتکس این دو با هم کاملاً مخلوط شده و محلول حاصل با سرعت ۵۰۰۰ RPM و به مدت ۱۰ min سانتریفوژ گردید. پس از حذف تکه‌های چربی، ۲ mL از لایه رویی محلول سانتریفوژ شده برداشت و با ۱ mL آب مخلوط گردید و تا زمان تزریق به دستگاه در فریزر 20°C نگهداری شد. قبل از تزریق به دستگاه، نمونه در دمای اتاق یخ‌زدائی گردید. برای اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش LC-MS/MS، ابتدا آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد با خلوص بالا از شرکت سیگما تهیه شدند (سیگما آلدریج، سنت لویز، میسوری، آمریکا). برای جداسازی ترکیبات از دستگاه کروماتوگرافی مایع (پرکین‌المر سری ۲۰۰، والتام، ماساچوست، آمریکا) مجهز به پمپ دوتایی، سمپلر خودکار و گرم‌کننده ستون استفاده شد. مشخصات ستون (هکتور ام، آراستک، دائجون، جمهوری کره) در جدول ۲ ارائه شده است. طیف‌سنجی جرمی با استفاده از طیف‌سنج جرمی دوتایی چهار قطبی سه‌گانه (اپی‌آی ۲۰۰۰، ابی سایاکس، فرامینگهام، ماساچوست، آمریکا) صورت پذیرفت. ابتدا بوسیله استاندارد هر آنتی‌بیوتیک، دستگاه برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد نظر تنظیم شده و برای بررسی صحت دستگاه از سه نمونه شیر خام عاری از آنتی‌بیوتیک استفاده شد. این

و کاملی در زمینه میزان آلودگی شیر خام تولیدی استان به آنتی‌بیوتیک‌ها انجام نگرفته است. گزارش‌های موجود دچار نقیصه‌هایی همچون موضعی بودن تحقیق و محدود شدن به یک شهر، استفاده از تست‌های کیفی سریع و عدم استفاده از تست‌های دقیق کمی همچون کروماتوگرافی، اندازه‌گیری یک یا دو آنتی‌بیوتیک و ... هستند. با توجه به اهمیت بهداشتی و صنعتی بقایای آنتی‌بیوتیکی، این تحقیق با هدف انجام غربالگری شیر خام در استان فارس برای این بقایا و تعیین مقادیر اکسی‌تتراسایکلین، انروفلوکساسین و پنی‌سیلین جی که از آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف در دامپزشکی و بویژه در پمادهای داخل پستانی هستند، در نمونه‌های مثبت شده در غربالگری و مقایسه آن با حداکثر مجاز باقیمانده مورد قبول سازمان دامپزشکی ایران انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در استان فارس واقع در جنوب ایران انجام شد که از نظر آب و هوایی دارای سه اقلیم سردسیر، معتدل و گرمسیر است. با توجه به ماهیت مطالعه حاضر و وسعت جامعه مورد نظر از یک طرف و بالا بودن هزینه نمونه‌گیری و انجام آزمایش‌ها از طرف دیگر، به‌منظور گردآوری اطلاعات در سطح استان، نمونه‌گیری به صورت طبقه‌بندی شده انجام شد. شهرستان‌های استان ابتدا بسته به شرایط آب و هوایی در سه طبقه سرد، معتدل و گرم قرار گرفتند. با توجه به امکانات موجود برای انجام مطالعه (ارزیابی کیفی ۴۰۰ نمونه شیر خام در هر فصل سال) و بر اساس مقدار شیر خام تولیدی (تقریباً ۱۸، ۵۵ و ۲۷ درصد به ترتیب برای اقلیم سرد، معتدل و گرم استان) تعداد نمونه برای هر منطقه تخمین زده شد. از ۱۶۰۰ نمونه اخذ شده تعدادی از نمونه‌های فصل زمستان به دلایل مختلف از آزمایش حذف شدند. تعداد ۱۵۷۰ نمونه شیر خام ابتدا با کیت اکلیمیسی ۵۰ (زد ای یو-ایمونوتک، زارگوزا، اسپانیا) از نظر باقیمانده آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. اساس کار این کیت بر اساس مهار رشد میکروبی است. کیت در قالب یک میکروپلیت ارائه شده و هر چاهک آن دارای محیط آگار حاوی اسپورهای باسیلوس استناروترموفیلوس و یک شاخص

بررسی اثرات فصل، اقلیم و محل نمونه‌گیری بر احتمال آلودگی نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک، از آزمون مربع کای (chi-square) استفاده شد. با قرار دادن فاکتورهای خطر معنی‌دار در آزمون رگرسیون لجستیک (logistic regression)، نسبت شانس (odds ratios) برای هر فاکتور تعیین شد. سطح آلفای ۵ درصد به عنوان مبنای قضاوت آماری قرار گرفت.

نمونه‌ها از گاوداری دانشکده کشاورزی و از گاوهایی با تاریخچه عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک گرفته شد. سپس اندازه‌گیری مقدار هر آنتی‌بیوتیک بر اساس منحنی استاندارد انجام شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ ابتدا به صورت توصیفی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تحلیل داده‌ها و

جدول ۱- حد جداسازی ($\mu\text{g/L}$) کیت اکلپسی برای برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر گاو

آنتی‌بیوتیک	منفی	مثبت
پنی سیلین	۲	۴
آمپی سیلین	۳	۵
آموکسی سیلین	۳	۵
اکساسیلین	۵	۲۵
کلوکساسیلین	۲۵	۴۰
سفالکسین	۲۵	۷۵
سفاپیرین	۵	۸
سولفاتiazول	۲۰	۷۵
سولفامتازین	۱۰۰	۲۰۰
سولفانیل آمید	۱۰۰	۶۰۰
اکسی‌تتراساکلین	۵۰	۱۵۰
تتراسایکلین	۵۰	۱۵۰
اریترومایسین	۲۰۰	۴۰۰
تایلوزین	۲۰	۱۰۰
نئومایسین	کمتر از ۵۰۰	۸۰۰

جدول ۲- مشخصات ستون کروماتوگرافی

نوع ستون	فاز معکوس
طول ستون	۳۰ mm
قطر ستون	۳ mm
اندازه ذرات	۳ μm
درجه حرارت ستون	۵۰ °C
فاز متحرک A	اسید فرمیک ۰/۰۲ درصد
فاز متحرک B	متانول
سرعت جریان	۰/۵ mm/min

یافته‌ها

در جدول ۳ نتایج این آزمایش‌ها با استفاده از کیت اکلپسی به تفکیک فصل، اقلیم و محل نمونه‌گیری نشان داده شده است. از کل نمونه‌های اخذ شده، ۱۴۴۹ نمونه (۹۲/۳ درصد) در آزمایش اکلپسی فاقد آنتی‌بیوتیک و ۱۲۱ نمونه (۷/۷ درصد) آلوده به آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شدند. در آزمون χ^2 مشخص شد که فصل ($\chi^2=18/356, p<0/01$) و محل نمونه‌گیری ($\chi^2=12/176, p<0/01$) اثر معنی‌داری بر روی بقایای آنتی‌بیوتیکی در شیر خام استان دارند. با قرار دادن فاکتورهای خطر معنی‌دار در مدل $\logistic\ regression$ مشخص گردید که مدل از لحاظ آماری معنی‌دار ($\chi^2(2)=28/26, p<0/01$) و نزدیک به ۴/۳ درصد واریانس (مقدار R^2) در آلودگی به آنتی‌بیوتیک را

شرح داده و حدود ۹۲ درصد موارد را به دقت رده‌بندی کرده است. نسبت شانس برای فاکتورهای خطر معنی‌دار در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان داد که شانس آلودگی در فصل زمستان بیشتر از سایر فصول بوده (نسبت شانس ۲/۴۳) و شیر خام در مراکز جمع‌آوری ۱/۵ برابر احتمال آلودگی به آنتی‌بیوتیک بیشتری نسبت به دامداری سنتی دارد. از ۲۲ نمونه شیر خام ارسالی برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی، تنها از ۶ نمونه (۲۷/۳ درصد) بقایای آنتی‌بیوتیکی جدا شد. از ۲ مورد بقایای دو آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین (به مقدار ۵۸/۲ و ۳۱/۵ μg/kg) و انروفلوکساسین (به مقدار ۹/۴ و ۴/۷ μg/kg)، از ۲ مورد فقط بقایای اکسی‌تتراسایکلین (به مقدار ۱۶/۷ و ۹/۹ μg/kg) و از ۲ مورد آخر فقط بقایای انروفلوکساسین (به مقدار ۳/۱ و ۱/۹ μg/kg) جدا شد.

جدول ۳- میزان آلودگی شیر خام به بقایای آنتی‌بیوتیکی به تفکیک فصل، اقلیم و محل نمونه‌گیری در استان فارس

فاکتور خطر	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه مثبت	میزان آلودگی (درصد)	مقدار کای (χ ²)	مقدار p
فصل				۱۸/۳۶	۰/۰۰۱
بهار	۳۹۷	۲۲	۵/۵		
تابستان	۳۹۶	۲۴	۶/۱		
پاییز	۴۰۲	۲۷	۶/۷		
زمستان	۳۷۵	۴۸	۱۲/۸		
اقلیم				۲/۸۰	۰/۲۴۷
سرد	۲۹۲	۱۶	۵/۵		
معتدل	۸۸۱	۷۰	۷/۹		
گرم	۳۹۷	۳۵	۸/۸		
محل نمونه‌گیری				۱۲/۱۸	۰/۰۰۷
گاوداری سنتی	۵۹۳	۴۷	۷/۹		
گاوداری صنعتی	۴۹۸	۲۵	۵/۰		
مرکز جمع‌آوری شیر	۳۸۲	۴۳	۱۱/۳		
کارخانه	۹۷	۶	۶/۲		

جدول ۴- نتایج رگرسیون لجستیک برای تعیین ارتباط فاکتورهای خطر با میزان آلودگی شیر خام به بقایای آنتی بیوتیکی

فاکتور خطر	مقدار B	خطای استاندارد	نسبت شانس	مقدار p	
				فاصله اطمینان ۹۵ درصد	پایین بالا
فصل					
بهار			۱/۰۰۰		
تابستان	۰/۰۵۳	۰/۳۱	۱/۰۵۵	۰/۸۶۲	۰/۵۸۰
پاییز	۰/۱۷	۰/۳۰	۱/۱۸۵	۰/۵۶۸	۰/۶۶۲
زمستان	۰/۸۹	۰/۲۷	۲/۴۲۶	۰/۰۰۱	۱/۴۳۰
محل نمونه‌گیری					
گاوداری سنتی			۱/۰۰۰		
گاوداری صنعتی	-۰/۴۷۰	۰/۲۵۷	۰/۶۲۵	۰/۰۶۷	۰/۳۷۸
مرکز جمع‌آوری شیر	۰/۳۹۸	۰/۲۲۴	۱/۴۸۹	۰/۰۷۵	۰/۹۶۰
کارخانه	-۰/۲۲۵	۰/۴۵۰	۰/۷۹۸	۰/۶۱۷	۰/۳۳۰

بحث

با مقایسه نتایج به دست آمده در این مطالعه و نتایج مطالعه‌ای که مقالات مرتبط با آنتی‌بیوتیک در شیر را در طول ۱۵ سال اخیر در ایران بررسی کرده است می‌توان دریافت که میزان آلودگی شیر خام به بقایای آنتی‌بیوتیکی در استان فارس در مقایسه با سایر تحقیقات انجام شده در کشور که با استفاده از کیت‌های کیفی تجاری مختلف انجام شده، هم سطح یا کمتر است. در مقاله مذکور ۳۱۴ مقاله، از منابع اطلاعاتی استخراج و ۳۸ مقاله برای مرور سیستماتیک انتخاب شدند و نتایج نشان داد که شیوع بقایای آنتی‌بیوتیک در شیر با روش کیفی، الیزا و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا، به ترتیب ۲۸، ۴۳ و ۲۷ درصد بوده است. بالا بودن میزان بقایای آنتی‌بیوتیکی در کشور به استفاده بی‌رویه، خودسرانه و غیرقانونی آنتی‌بیوتیک‌ها در مزارع پرورشی و عدم توجه به توصیه‌های بهداشتی و دامپزشکی در این زمینه نسبت داده شده است. همچنین شیوع ورم پستان در گاوها و عدم رعایت اصول بهداشتی در مزارع از دیگر عوامل اثرگذار در این زمینه است (۱۰). نتایج مطالعه حاضر نسبت به میانگین فوق و همچنین نتایج گزارش شده از شهرستان فسا بسیار پایین‌تر است، اما با گزارشی که میزان آلودگی به بقایای آنتی‌بیوتیکی در شهرستان‌های سپیدان و بیضا (واقع در اقلیم سرد استان فارس) را ۵ درصد اعلام نموده همخوانی دارد (۱۱، ۱۲). استفاده از کیت‌های تجاری تشخیص آنتی‌بیوتیک در شیر خام مبتنی بر مهار رشد میکروارگانیسم، روشی قابل اجرا در مراکز جمع‌آوری و فرآوری برای غربالگری سریع شیرخام در زمان دریافت است که قادر است وجود مواد بازدارنده رشد میکروبی شامل آنتی‌بیوتیک‌ها حتی در مقادیر جزیی را نشان دهد. اما مقایسه نتایج حاصله با روش‌های غربالگری همچون دلو تست (Delvo test) با آزمایش‌های تأییدی همچون کروماتوگرافی مایع همراه با طیف‌سنجی جرمی متوالی نشان داده که این روش‌ها بدلیل وجود نتایج منفی کاذب کمتر قابل اعتماد هستند (۱۳). در این تحقیق فقط از ۲۷/۳ درصد موارد مثبت شده در کیت‌های تجاری، آنتی‌بیوتیک جدا گردید که این موضوع می‌تواند ناشی از عدم دقت و صحت

کیت‌های مورد مصرف، وجود آنتی‌بیوتیک‌های دیگری به غیر از موارد اندازه‌گیری شده با روش کروماتوگرافی در شیر خام و یا وجود سایر مهارکننده‌های میکروبی در شیرخام است. اگرچه در مطالعه حاضر پنی‌سیلین جی از هیچ نمونه‌ای جدا نشد، اما محققان با استفاده از کروماتوگرافی مایع به همراه طیف‌سنجی جرمی متوالی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری نشان دادند که از ۱۸ نمونه مثبت شده با تست‌های سریع، از ۱۶ نمونه مقادیری از پنی‌سیلین جی به تنهایی یا همراه با سایر بتالاکتام‌ها جدا شده و نتیجه‌گیری شده که این روش ابزاری مفید برای تأیید نتایج تست‌های سریع و در موارد مشکوک برای تأیید و تعیین مقدار آنالیت‌های مختلف است (۱۴). اعتبارسنجی این روش برای پایش ۵۸ آنتی‌بیوتیک در شیر نشان داد که این روش برای جداسازی و تعیین مقدار آنتی‌بیوتیک‌ها از ۸ خانواده پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، سولفانامیدها، ماکرولیدها، لینکوزامیدها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها و کوینولون‌ها مناسب است (۶). در مطالعه‌ای دیگر نیز با هدف بررسی دقت، صحت و حساسیت روش کروماتوگرافی مایع همراه با طیف‌سنجی جرمی متوالی برای تعیین همزمان ۲۳ داروی دامپزشکی از ۷ رده مختلف آنتی‌بیوتیکی در شیر خام انجام شد و نتایج معتبرسازی این روش نشان داد که تمامی شاخص‌ها منطبق با قوانین کمیسیون اروپایی بوده و برای تعیین بقایای آنتی‌بیوتیکی در شیر گاو کاربردی است. همچنین مشخص شد که میزان آلودگی از ۱۸۹ نمونه شیر خام، ۷/۴۱ درصد بوده، اما غلظت هیچ‌یک از نمونه‌ها از حد مجاز فراتر نبود (۱۵).

با توجه به حد مجاز $100 \mu\text{g/L}$ برای بقایای تتراسایکلین و انروفلوکساسین و $10 \mu\text{g/L}$ برای بقایای پنی‌سیلین جی در شیرخام توسط سازمان دامپزشکی کشور، مقادیر اندازه‌گیری شده در نمونه‌ها همگی زیر حد مجاز بودند (۱۶). از ۴ نمونه شیر مقادیری از انروفلوکساسین جدا گردید که اگرچه کمتر از حد مجاز است، اما خطرات سلامت کوینولون‌ها در بچه‌ها بالاتر از بالغین ذکر شده و این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها نزدیک به ۸۹ درصد از خطرات سلامت مربوط به همه آنتی‌بیوتیک‌ها را در کشور چین شامل شدند (۱۷). بر خلاف نتایج حاصل از

شیر در شهرستان فسا نیز نشان داد که میزان آلودگی شیر خام به آنتی‌بیوتیک در دامداری‌های سنتی به طور چشمگیری بیشتر از دامداری‌های صنعتی بوده و علت اصلی آن را به عدم رعایت اصول بهداشتی در دامداری‌های سنتی و عدم نظارت کافی نسبت دادند (۱۱). استفاده از کروماتوگرافی نشان داده که تقریباً ۷۵ و ۶۳ درصد از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت حاد به ترتیب در ۷۲ و ۹۶ h پس از دریافت دارو، مقادیر تتراسایکلین بیش از حد مجاز را در شیر داشتند (۲۳). در برخی تحقیقات میزان نمونه‌های آلوده در شیرهای پاستوریزه نسبت به شیر خام بالاتر گزارش شده است که دلیل آن آزمایش شیرهای ورودی به کارخانه از نظر بقایای آنتی‌بیوتیکی و استفاده از شیرهای خام سالم و بدون آنتی‌بیوتیک برای تهیه شیرهای استریل و فرآورده‌های لبنی تخمیری و هدایت شیرهای آلوده و با کیفیت پایین عمدتاً به خط تولید شیر پاستوریزه که یک فرآورده لبنی پایه و پرمصرف است، عنوان شده است (۲۴).

نتیجه‌گیری

اگرچه مقادیر آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین، انروفلوکسازین و پنی‌سیلین جی جدا شده از شیر خام استان فارس بسیار پایین‌تر از حد مجاز بود، اما به دلیل احتمال وجود سایر مواد ضد میکروبی، لازم است تا اقدامات اجرایی، آموزشی و پژوهشی بیشتری همچون پایش نقطه‌ای و مستمر شیر خام در مسیر تولید تا تحویل، فراهم نمودن امکانات لازم برای نمونه‌گیری و انجام آزمایش سریع توسط دامداران، تعیین نوع و مقدار مواد مهار کننده رشد میکروبی در نمونه‌های مثبت شده در آزمایش‌های سریع و ارتقاء آگاهی تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان از خطرات بقایای آنتی‌بیوتیکی برای به حداقل رساندن این بقایا در شیر خام صورت گیرد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

این مطالعه، تحقیقات انجام شده در شهرستان فسا نشان داد که تعداد نمونه‌های دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی در شیر خام در فصل تابستان نسبت به سایر فصول بالاتر بوده (۱۰) در حالی که در مطالعه حاضر تعداد نمونه‌های دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی در شیر خام در فصل زمستان نسبت به سایر فصول بالاتر بود است که این موضوع می‌تواند ناشی از شیوع بالاتر ورم پستان در گاوداری‌های استان فارس در فصل زمستان نسبت به سایر فصول سال باشد (۱۸). علاوه بر درمان ورم پستان، از دیگر عوامل حضور بقایای آنتی‌بیوتیکی در شیر خام می‌توان به مواردی همچون استفاده بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان سایر بیماری‌ها، پیشگیری از عفونت (در گاوهای خشک و پس از اعمال جراحی) و تحریک رشد دام، محدودیت امکانات آزمایش و شناسایی باقیمانده‌ها در زمان دریافت شیر خام، عدم آگاهی دامداران از خطرات بقایای آنتی‌بیوتیکی، کم کاری کارخانه‌های لبنی در آموزش دامداران و جدا نکردن دام‌های تحت درمان در زمان شیردوشی اشاره کرد (۲). در این مطالعه همچنین مشخص شد که تعداد نمونه‌های آلوده اخذ شده از مراکز جمع‌آوری به شکل معنی‌داری بالاتر از سایر محل‌های نمونه‌گیری است. این موضوع می‌تواند ناشی از عدم کنترل شیرهای خام ورودی به مرکز باشد. Hashemi و همکار (۲۰۰۸) مخزن مرکز جمع‌آوری شیر را به عنوان یک کانون بحرانی برای آلودگی، به ویژه برای بار میکروبی شیر خام دامداری‌های سنتی معرفی کردند (۱۹). در تأیید یافته‌های این مطالعه، محققان در شمال غربی ایران گزارش کردند که شانس آلودگی شیر به بقایای آنتی‌بیوتیکی در فصل زمستان ۳/۷۳ برابر فصل پاییز و در شیر خام موجود در مراکز جمع‌آوری شیر، ۶/۲۷ برابر نسبت به شیر خام موجود در کارخانه است (۲۰). بر خلاف گزارش‌های ارائه شده از شهرستان‌های سنندج، مراغه و بناب، در مطالعه حاضر میزان بقایای آنتی‌بیوتیک در شیر گاوداری‌های سنتی نسبت به گاوداری‌های صنعتی بیشتر بود که می‌تواند ناشی از عدم رعایت فاصله زمانی بین تجویز آنتی‌بیوتیک و عرضه شیر به بازار، وضعیت بهداشتی نامناسب و مدیریت ضعیف گاوداری‌های سنتی باشد (۲۱، ۲۲). همچون نتایج مطالعه حاضر، بررسی باقیمانده آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پروژه تحقیقاتی با کد ۹۴۱۱۰-۱۳-۵۰-۴ مصوب سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی بوده و

بدینوسیله از پرسنل اداره کل دامپزشکی استان فارس بدلیل همکاری در انجام نمونه‌برداری و آقای دکتر سامان ناهید به جهت مشارکت در انجام آزمایش‌های این تحقیق، تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Our World in Data. Antibiotic usage in livestock. England and Wales: Global Change Data Lab; 2020 [cited 21 November 2023]. Available from: <https://ourworldindata.org/grapher/antibiotic-usage-in-livestock?tab=table>.
2. Sachi S, Ferdous J, Sikder MH, Hussani SMAK. Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2019;6(3):315-32.
3. Daliri M, Javdan G, Sharifinia M. Erythromycin residues concentration in urban wastewater discharged into the Persian Gulf marine environment (a case study: Bandar Abbas city). *Iranian Journal of Health and Environment*. 2021;14(3):399-412 (in Persian).
4. Hashemi M. Prevalence of antibiotic resistance among bacterial pathogens isolated from dairy cows with mastitis in Fars province. *Veterinary Journal (Pajouhesh and Sazandegi)*. 2016;112:85-93 (in Persian).
5. Eswar D. Analysis of antibiotics in milk and its products. In: Toldrá F, Nollet LML, editors. *Handbook of dairy foods analysis*. London: CRC Press; 2021. p. 865-79.
6. Gaugain-Juhel M, Delepine B, Gautier S, Fourmond MP, Gaudin V, Hurtaud-Pessel D, et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 2009;26(11):1459-71.
7. Tasci F, Canbay HS, Doganturk M. Determination of antibiotics and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Food Control*. 2021;127:108147.
8. Fars Province Management and Planning Organization. *Statistical Yearbook of Fars Province*. Shiraz: Deputy of Statistics and Information; 2022 (in Persian).
9. Jank L, Martins MT, Arsand JB, Hoff RB, Barreto F, Pizzolato TM. High-throughput method for the determination of residues of beta-lactam antibiotics in bovine milk by LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 2015;32(12):1992-2001.
10. Jolaei H, Abdollahi M, Safarirad M, Berizi E, Yousefi MH, Noori SMA. Prevalence of antibiotic residues in milk consumed in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Health Sciences and Surveillance System*. 2023;11(4):696-703.
11. Askari Z, Jafarpour D. Determination of antibiotic residues in traditional and industrial raw milks produced in Fasa city during 2019-20. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 2023;15(4):59-70 (in Persian).
12. Mollaei AR, Hamidian Shirazi M, Hamidian

- Shirazi AR. Comparative evaluation of antibiotic residues in raw milk samples by ECLIPS 50 and TWINE SENSOR kits in Sepidan and Beyza, Iran. *Journal of Health Sciences and Surveillance System*. 2018;6(2):106-10.
13. Layada S, Benouareth D, Coucke W, Andjelkovic M. Assessment of antibiotic residues in commercial and farm milk collected in the region of Guelma (Algeria). *International Journal of Food Contamination*. 2016;3:19.
14. Riediker S, Diserens JM, Stadler RH. Analysis of beta-lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(9):4171-76.
15. Alija G, Hajrulai-Musliu Z, Uzunov R. Development and validation of confirmatory LC-MS/MS method for multi-residue analysis of antibiotic drugs in bovine milk. *SN Applied Sciences*. 2020;2:1563.
16. Iran Veterinary Organization (IVO). Maximum residue limits for veterinary drugs, toxins and heavy metals in raw milk. Tehran, Iran: Iran Veterinary Organization; 2011 [cited 2023 November 21]. Available from: <https://ivo.ir/XbEa> (in Persian).
17. Niu C, Yan M, Yao Z, Dou J. Antibiotic residues in milk and dairy products in China: occurrence and human health concerns. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023;30(53):113138-50.
18. Hashemi M, Kafi M, Safdarian M. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2011;36(3):239-41.
19. Hashemi M, Shekarforoush S. Microbial and chemical changes of raw milk in various stages of production in industrial dairy farms of fars province. *Journal of Veterinary Research*. 2008;63(3):221-27 (in Persian).
20. Alimohammadi M, Askari S, Azghadi NM, Taghavimanesh V, Mohammadimoghadam T, Bidkhor M, et al. Antibiotic residues in the raw and pasteurized milk produced in Northeastern Iran examined by the Four-Plate test (FPT) method. *International Journal of Food Properties*. 2020;23(1):1248-55.
21. Habibi N. Study of antibiotics residual in raw milk in Sanadaj. *Large Animal Clinical Research Journal*. 2010;11(4):57-62 (in Persian).
22. Zarangush Z, Mahdavi S. Determination of antibiotic residues in pasteurized and raw milk in Maragheh and Bonab counties by Four Plate test (FPT) method. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2016;24(5):48-54 (in Persian).
23. Magon T, Silveira Rd, Galuch MB, Fagan EP, Feitoza AFD, Palombini SV, et al. Simultaneous determination of four antibiotics in raw milk by UPLC-MS/MS using protein precipitation as sample preparation: development, validation, and application in real samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2018;29(11):2441-48.
24. Akbari Kishi S, Asmar M, Mirpour MS. The study of antibiotic residues in raw and pasteurized milk in Gilan province. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2017;11(3):71-77 (in Persian).



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



Evaluation of antibiotic residues in raw milk of Fars province by rapid method in 2018 and determining the amount of oxytetracycline, enrofloxacin and penicillin G in contaminated samples

Majid Hashemi^{1*}, Mohammad Javad Agah², Amir Mahmoud Rastegar³

1- Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

2- Animal Science Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

3- Department of Education and Research, Veterinary General Office of Fars Province, Veterinary Organization, Shiraz, Iran

ARTICLE INFORMATION:

Received: 27 December 2023

Revised: 06 March 2024

Accepted: 12 March 2024

Published: 10 June 2024

Keywords: Antibiotic residues, Raw milk, Maximum residue limit, Screening, LC-MS/MS

*Corresponding Author:

majid48h@yahoo.com

mj.hashemi@areeo.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objective: Paying attention to antibiotic residues in milk is important due to its health effects on the occurrence of microbial resistance in consumers, as well as its harmful effects on the dairy industry. This study was carried out with the aim of determining the amount of oxytetracycline, enrofloxacin, and penicillin G in raw milk samples produced in Fars province, which were detected as contaminated during screening with a rapid kit.

Materials and Methods: The samples were first examined with a rapid commercial kit for the presence of antibiotic residues. Then the amount of oxytetracycline, enrofloxacin and penicillin G antibiotics in the positive samples belonging to the middle month of each season was determined using the liquid chromatography-tandem mass spectrometry method.

Results: Antibiotic residues were found in 121 (7.7%) samples by the commercial Eclipse kit. Both season ($p < 0.001$) and region ($p < 0.01$) of sampling had a significant effect on antibiotic residues in raw milk. In the chromatographic method, antibiotic residues of oxytetracycline and enrofloxacin were detected in 6 (27.3%) samples, none of which exceeded the permissible limit determined by the Iranian Veterinary Organization.

Conclusion: Although the amount of antibiotics detected from raw milk from Fars province was much lower than the permissible limit, it is necessary to implement further executive, educational, and research measures to minimize these residues in raw milk due to the possibility of the presence of other antimicrobial substances.

Please cite this article as: Hashemi M, Agah MJ, Rastegar AM. Evaluation of antibiotic residues in raw milk of Fars province by rapid method in 2018 and determining the amount of oxytetracycline, enrofloxacin and penicillin G in contaminated samples. Iranian Journal of Health and Environment. 2024;17(1):59-70.

