Archive of SID

ارزیابی باقیمانده برخی آنتی‌بیوتیکها در درمان تجربی ماهیان کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین کمان به روش میکروبیولوژیک و کروماتوگرافی توأم با بیواتوگرافی

دکتر سید سعید میرزرگر[1]، دکتر مهدی سلطانی[1]، دکترمینا رستمی[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه‌تهران، دوره ۵۵ ، شماره ۱، ۲۷-۲۱، (۱۳۷۹)

با توجه به اهمیت کنترل میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیکها در آبزیان خوراکی و درمان باکتریایی ماهیان پرورشی، در این تحقیق از روشهای میکروبیولوژیک (Bioassay) و کروماتوگرافی لایه نازک توأم با بیواتوگرافی (TLC-B) برای ردیابی و تعیین باقیمانده برخی آنتی‌بیوتیکهای متداول، اکسی‌تتراسیکلین (OTC)، کلرتتراسیکلین (CTC)، فلومکوئین (FLM) و مخلوط تری‌متوپریم و سولفادیمیدین (TMP+SUL) در سرم و بافتهای دوگونه مهم ماهیان پرورشی، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) استفاده گردید. جهت درمان تجربی با به‌کارگیری مقادیر درمانی توصیه شده جهت درمان برخی بیماریهای میکروبی ماهیان با روشهای حمام، خوراکی و تزریقی مورد استفاده قرار گرفتند. مقدار داروی مورد استفاده در روش حمام به میزان ۲۰۰ قسمت در میلیون (ppm) به‌مدت یک ساعت و در روش خوراکی (جهت ماهی قزل‌آلا) به میزان ۸۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن زنده، برای داروی OTC و به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن زندهٔ ماهی جهت داروی فلومکوئین و در روش تزریقی (داخل صفاقی) ۱۰ میلی‌گرم به‌ازاء هر کیلوگرم وزن زندهٔ ماهی از هر نوع دارو بود. در روش میکروبیولوژیک حداکثر میزان باقیمانده OTC در کلیه کپور به روش حمام (۲۰۰ ppm) تا ۱۰/۳۳ میکروگرم به‌ازاء هر گرم بافت ($\mu g/g$) و در کلیه قزل‌آلا به روش خوراکی به‌مقدار ۸۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن زندهٔ ماهی (mg/kgb.w.) تا ۴/۴۷ $\mu g/g$ تعیین گردید، در حالی که در بافتهای کبد و عضله گونه‌های مذکور غیرقابل ردیابی بود. مصرف CTC و TMP + SUL به روش حمام (۲۰۰ ppm) در کپور عمدتاً موجب ردیابی باقی‌مانده آنها به ترتیب به‌میزان ۰/۳، ۰/۵۹ و ۰/۴۶ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافتهای سرم و کلیه تا ۲۴ ساعت پس از درمان گردید. مصرف خوراکی FLM (۱۰mg/kgb.w.) در قزل‌آلا موجب جذب آن تا سطح ۲/۳۷ میکروگرم در میلی‌لیتر ($\mu g/mL$) در سرم ۳/۱۸$\mu g/g$ در عضله ۲/۰۵$\mu g/g$ در هر یک از بافتهای کبد و کلیه گردید، در حالی که مصرف آن به روش حمام (۲۰۰ppm) در کپور غیرقابل ردیابی بود. تعیین باقیمانده داروهای مذکور به روش TLC-B در بافتهای ماهیان تحت آزمایش عمدتاً مشابه روش میکروبیولوژیک اما باقیمانده داروها تا فواصل زمانی طولانی‌تری قابل ردیابی بود. مصرف توأم داروهای تزریقی (داخل صفاقی) از مخلوط مقادیر یکسان داروهای تحت بررسی، منجر به عدم تفکیک باقیمانده آنها در سرم و عصاره بافتها در روش TLC-B گردید.

واژه‌های کلیدی: بیواتوگرافی، باقیمانده دارویی، آنتی‌بیوتیک، سولفونامید، ماهی.

از آنجایی که نیاز به کنترل میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیکها در مواد غذایی مورد مصرف انسانی (از جمله آبزیان خوراکی) امری مهم و حساس می‌باشد، لذا توجه به روشهای حساس برای تعیین میزانهای باقیمانده این گونه داروها امری بدیهی است. بعلاوه این موضوع نه تنها از بعد بهداشت عمومی حایز اهمیت می‌باشد بلکه از نظر درمان عفونتهای میکروبی در ماهی و سایر آبزیان نیز قابل توجه است زیرا استاندارد نمودن یک مقدار درمانی برای کنترل و درمان یک عفونت میکروبی ویژه و در یک گونه خاص ماهی پرورشی مستلزم اطلاع قبلی از فراهمی زیستی (biovailability) و زمان قطع و میزان باقیمانده دارو (residual/withdrawal time) و کیفیتهای مختلف آب می‌باشد. به‌کارگیری هر نوع داروی آنتی‌بیوتیک جهت مقابله با یک بیماری خاص نیازمند اطلاع از میزانهای دارو در بدن جانوران (خشکی‌زی) به‌کار گرفته شده است ولی دامنه و سوابق تجربه به‌کارگیری این روشها در جانوران آبزی بویژه گونه‌های خوراکی و پرورشی بسیار اندک می‌باشد.

در میان روشهای میکروبیولوژیک متداول جهت اندازه‌گیری مقادیر باقیمانده آنتی‌بیوتیکها در مواد غذایی و بافتهای جانوری روش استفاده از دیسک (۲۴، ۱۸، ۱۳) در حالی که از سایر روشها مانند: آزمون احیاء سیاه درخشان (Brilliant black reduction test)، Delvotest و آزمون سواپ (The Swab Test On Premisess=STOP) بندرت استفاده شده است. اندازه‌گیری و ردیابی باقیمانده آنتی‌بیوتیکهای متفاوت در بافتهای گونه‌های ماهیان مختلف با استفاده از سایر روشها نیز انجام گرفته که از جمله می‌توان به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) (۲۶، ۲۳، ۲۲، ۱۹، ۱۵، ۱۰، ۹، ۸، ۶)، روش Radio-lable (۸)، روش کروماتوگرافی مایع (۵ و ۲۰) و روش گازکروماتوگرافی - اسپکتروفتومتری جرمی (GC-MS) (۹)، اشاره نمود.

از مجموع مطالعات مذکور این‌گونه استنباط می‌شود که با توجه به متغیر بودن نتایج حاصل از روشهای مختلف اندازه‌گیری باقیمانده داروها در بافتها و سرم ماهیان، مقایسه آنها کاری دشوار بوده و نیاز به مطالعات بیشتری جهت یافتن روشهای متداول، حساس، ارزان و قابل تکرار می‌باشد. در پژوهش حاضر با به‌کارگیری مقادیر درمانی داروهای اکسی‌تتراسیکلین، کلرتتراسیکلین، فلومکوئین، اکسولینیک اسید و تری‌متوپریم توصیه شده جهت درمان برخی بیماریهای میکروبی ماهیان به روشها حمام و خوراکی، اقدام به تجویز داروهای مذکور در گونه قزل‌آلای رنگین کمان و کپور معمولی سالم گردیده، سپس با نمونه‌برداری از سرم، بافت عضلانی، کلیه و کبد ماهیان در فواصل زمانی متفاوت و تعیین میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیکها در این بافتها به روشهای میکروبیولوژیک و کروماتوگرافی توأم با بیواتوگرافی، نسبت به ارزیابی اثرات این‌گونه روشهای درمانی در زمان مقابله با بیماریها و دامنه حساسیت این روشها اقدام گردید.

مواد و روش کار

الف - مواد

۱. آنتی‌بیوتیکهای مورد استفاده: برای انجام آزمایشهای In vitro و نیز درمان‌به روش تزریقی‌ازاکسی‌تتراسیکلین(Oxytetracycline = OTC) (Sigma) تری‌متوپریم (Trimethoprim = TMP) (Sigma). کلرتتراسیکلین (Chlortetracycline = CTC) (پارس‌رازی) و فلومکوئین (Flumequine=FLM)

۱) گروه آموزشی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

(بخش دارویی سازمان دامپزشکی) استفاده شد.

آنتی‌بیوتیکهای مورد استفاده جهت مطالعات In vivo عبارت بودند از: مخلوط TMP و سولفادیمیدین (Sulphadimidine) با نام تجاری سولفاتریم (Sulphatrim) به‌صورت پودر محلول در آب ۴۸ درصد (Franklin Pharmaticals هلند) و OTC به‌صورت پودر محلول در آب ۲۰ درصد (داملران)، CTC، پودر محلول در آب ۲۰ درصد (پارس رازی) و FLM، پودر محلول در آب ۱۰ درصد (شرکت تولید داروهای دامی ایران).

۲. محیط کشت: به‌منظور انجام‌آزمایشهای میکروبیولوژیک و بیواتوگرافی‌از محیط کشت آگار مولرهینتون (Oxoid با ۰/۲ ± ۷/۲ = Muller-Hinton agar, pH) استفاده گردید.

۳. باکتری: باکتری باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtilis*, PTCC 1254)، اهدایی بخش بیوتکنولوژی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی کشور به عنوان ارگانیسم نشانگذار در هر دو روش میکروبیولوژیک و بیواتوگرافی به‌کار گرفته شد. براساس منابع موجود ارگانیسم مذکور در مقایسه با سایر ارگانیسمهای موجود به میزان بیشتری برای انجام چنین آزمایشهایی استفاده شده است.

۴. ماهی: برای انجام این تحقیق از دو گونه ماهی پرورشی متداول، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ۲۵۰ - ۵۰ گرمی و قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ۱۰۰ - ۱۰، ۱۸۰ - ۵۰ و ۲۵۰ - ۷۵گرمی استفاده گردید.

ماهیان کپور معمولی مورد آزمایش از کارگاه پرورشی مؤسسه تحقیقات امین‌آباد وابسته به جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی تهیه گردیده بود. ماهیان مذکور پس از انتقال به آکواریومهای ۲۰۰۰ لیتری اتاق آکواریوم دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به مدت یک هفته به‌منظور سازگاری ماهیان با محیط و شرایط جدید نگهداری و سپس تحت آزمایش قرار می‌گرفتند.

قزل‌آلای رنگین کمان مورد استفاده در این مطالعه از کارگاههای پرورش قزل‌آلای جاجرود (وابسته به بانک کشاورزی) و یکی از کارگاههای خصوصی پرورش قزل‌آلا واقع در جاده هراز (کارگاه آقای فخاری) تأمین گردیدند.

۵. صفحات کروماتوگرافی: به منظور انجام آزمایشهای کروماتوگرافی لایه نازک توأم با بیواتوگرافی (Thin Layer Chromatography-Bioautography TLC-B) = از صفحات سلولزی (بدون اندیکاتور فلورسنت) به ابعاد ۲۰×۱۰cm و ضخامت ۰/۱mm (Merck) و صفحات سیلیکاژل به ابعاد ۲۰×۲۰cm و ضخامت ۰/۲۵mm (۶۰) عاری از فلورسنت (Merck) استفاده گردید.

ب - روش کار

۱- رژیمهای درمانی

الف - کپور معمولی: در هر روش درمانی کپور معمولی تعدا ۱۵ قطعه ماهی (برای روشهای حمام) و ۱۰ قطعه (برای هر روش تزریق) با دامنه وزنی ۲۸۰-۵۰ گرم در نظر گرفته شد. به‌علاوه دو گروه کنترل نیز انتخاب و از سرم و بافتهای آنها به عنوان نمونه‌های کنترل منفی استفاده شد.

عملیات درمانی در اتاق آکواریوم گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صورت گرفت مقادیر مورد نیاز آنتی‌بیوتیک برای هر روش در زمان انجام درمان و با استفاده از ترازوی حساس با ۴ رقم اعشار تهیه شد. درجهٔ حرارت آب به هنگام اعمال رژیمهای درمانی ۲۰ درجه سانتیگراد بود. در روش تزریق ابتدا ماهیان را با استفاده از تری‌کائین متان سولفونات (MS222) به‌میزان ۴۰mg/Lit بیهوش نموده، سپس ماهیان را به‌صورت انفرادی توزین و به هر ماهی مقدار مورد نیاز تزریق می‌گردید. در روش حمام داروهای OTC، CTC، FLM و SUL + TMP بشکل تجاری به مقدار ۲۰۰ppm و به‌مدت یک ساعت استفاده شد. در روش تزریقی ماهیان تحت درمان از ترکیب داروی خالص OTC با اشکال خالص داروهای دیگر (به‌ترتیب(CTC، TMP و FLM) به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازاء کیلوگرم وزن زنده بدن‌تحت تزریق داخل صفاقی برای یک نوبت قرار گرفتند.

ب - قزل‌آلا: در مورد روشهای درمانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از ماهیان ۱۰۰-۱۰ گرمی (تعداد ۱۲ قطعه ماهی برای ترکیب دارویی) در روش تزریقی، در اتاق آکواریوم گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و از ماهیان ۲۵۰-۷۵گرمی (تعداد ۳۲ قطعه ماهی برای هر ترکیب دارویی) برای روش خوراکی، در یکی از کارگاههای پرورش قزل‌آلا (کارگاه فخاری واقع در کیلومتر ۹۰ جاده هراز) استفاده گردید. در روش تزریقی ماهیان بیهوش شده به‌صورت داخل صفاقی تحت درمان یا ترکیب OTC خالص با اشکال خالص داروهای دیگر (CTC ، TMP ، FLM) به میزان ۲۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن برای یک نوبت قرار گرفتند. دمای آب آکواریومها هنگام آزمایش ۱۵ درجهٔ سانتیگراد بود. در روش خوراکی پس از تعیین زی‌توده (Biomass) ماهیان هر گروه روش درمانی، تعیین میزان تغذیه (۲/۵ درصد در روز) نسبت به محاسبه میزان داروی مورد نیاز به‌طور روزانه اقدام و پس از تزریق و حل نمودن آن با استفاده از حلالهای مربوطه، دارو را با استفاده از محلول ژلاتین (۳۵g/lit)با دمای حدود ۳۵°C روی پلت روزانه اسپری کرده و پس از نیم‌ساعت اقدام به تغذیه ماهیان می‌شد. از داروهای OTC و FLM (شکل تجارتی) به ترتیب به میزان ۸۰ و ۱۰ میلی‌گرم به ازاء کیلوگرم وزن زندهٔ بدن به‌مدت ۵ روز مصرف گردید. حدود ۲ روز قبل از شروع درمان خوراکی تغذیه ماهیان قطع تا بتوان داروی مخلوط با غذا را به راحتی به‌مصرف ماهیان رساند. ماهیان سه مرتبه در روز مورد تغذیه قرار می‌گرفتند تا مقدار داروی مورد نظر در روز به مصرف برسد. دمای آب کارگاه به هنگام انجام آزمایشها ۱۱ درجهٔ سانتیگراد بود.

۲- نمونه‌گیری (سرم و بافتها)

الف - کپور معمولی: در روش حمام در فواصل زمانی ۳۳۶، ۱۶۸، ۲۴، ۱۲، ۴ ساعت پس از درمان (در مورد OTC تا ۶۷۲ ساعت) نسبت به تهیهٔ نمونه از سرم، کبد، کلیه و بافت عضلانی ماهیانی که تحت درمان داروهای OTC، CTC FLM و SUL + TMP بودند، اقدام گردید. در روش تزریق در فواصل زمانی ۱۶۸ و ۲۴، ۱۲، ۴ ساعت پس از درمان از سرم، کبد، کلیه و عضله ماهیانی که با ترکیبات دارویی OTC + CTC، OTC + FLM و OTC + TMP تزریق شده بودند، نمونه‌گیری به‌عمل آمد. برای تهیه سرم از سیاهرگ ساقه دمی به‌صورت شکمی یا جانبی و یا از ناحیه قلب، (تعداد ۳-۲ ماهی در هر مرحله زمانی) توسط سرنگهای استریل ۵ml-۲ (پس از بیهوشی مکانیکی) خون‌گیری به‌عمل آمد. خونهای حاصله به آزمایشگاه منتقل و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق باقی می‌ماند و پس از چند ساعت نگهداری در یخچال (۴°C) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و سرمهای جدا شده با پیپت پاستور در میکروتیوبهای اپندورف (Ependorf) جمع‌آوری و پس از درج مشخصات در فریزر ۲۰°C- تا زمان استفاده نگهداری می‌شدند. جهت تهیه نمونه‌های بافتی (کبد، کلیه، عضله) بلافاصله پس از خون‌گیری از ماهی اقدام به کالبدگشایی آن نموده و به مقادیر مورد نیاز از بافتهای مذکور (تمامی کلیه و کبد و قسمتی از عضله ناحیه دیواره شکمی) برداشت شده و تا زمان تهیه عصاره بافتی در فریزر ۲۰°C- قرار می‌گرفتند. از نمونه‌های بافتی تهیه شده یک روز بعد از نمونه‌برداری با استفاده از الکل متیلیک (متانول خالص) عصارهٔ بافتی تهیه و پس از علامتگذاری در داخل میکروتیوبهای اپندورف (Ependorf) تا زمان انجام آزمایشها در فریزر ۲۰°C- نگهداری می‌شدند.

ب - قزل‌آلای رنگین‌کمان: در مورد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نیز در روش تزریقی (که در اتاق آکواریوم نمونه‌گیری به‌عمل می‌آمد) روش نمونه‌برداری

www.SID.ir

Archive of SID

دقیقاً مشابه با کپور ماهیان بود. اما در مورد ماهیان تحت درمان خوراکی آزمایشها و نمونه‌گیری در محوطه کارگاه و سالن انکوباسیون انجام می‌گرفت. ابتدا نمونه‌های خون و بافت تهیه شده به یخچال واقع در کارگاه منتقل و در اسرع وقت داخل یخدانهای حاوی یخ به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی حمل و در یخچال و فریزر (۲۰°C-) نگهداری می‌شدند. در روش خوراکی نمونه‌برداری از سرم و بافتهای کبد، عضله و کلیه ماهیانی که تحت درمان شکل تجارتی داروهای OTC و FLM بودند در فواصل زمانی ۹۶، ۴۸، ۲۴، ۱۲، ۵ و ۱ ساعت پس از آخرین تغذیه (درمان)، انجام شد.

۳- تعیین باقیمانده دارو

۱ - ۳ - روش میکروبیولوژیک (Bioassay): به‌منظور تعیین میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیکها در سرم خون و بافتهای ماهیان تحت درمان از روش بیان شده توسط سلطانی و همکاران استفاده گردید(۴ و ۲۵). در این روش ابتدا منحنیهای استاندارد مربوط به هر یک از داروهای مورد نظر شامل: OTC، CTC، TMP و FLM در آب مقطر تهیه گردید. جهت تعیین مقادیر داروها در سرم و عصاره‌های بافتی به وسیلهٔ روش میکروبیولوژیک (Bioassay) از محیط آگار مولر - هینتون (MHA) حاوی تعلیق اسپور باسیلوس سابتیلیس (*B. subtilis*) به‌عنوان ارگانیسم معرف، استفاده شد. میزان ۵۰μl از هر یک از رقتهای CTC(از ۰/۳-۱۰μg/ml)، TMP(۰/۳-۱۰μg/ml)، OTC(۰/۳-۱۰μg/ml) و FLM(۰/۳-۱۰μg/ml) در هر یک از گوده‌های ۵ میلی‌متری ایجاد شده در پلیتهای شیشه‌ای (به‌قطر ۱۴ سانتیمتر) حاوی محیط MHA ریخته و پلیتها را در ۲۴°C (درجه حرارت آزمایشگاه) به‌مدت ۲ ساعت و در درجه حرارت ۳۵° برای طول شب (حدود ۸ تا ۱۰ ساعت) در انکوباسیون نگهداری شدند و آزمایشها برای هر نوع آنتی‌بیوتیک سه مرتبه تکرار گردید. با توجه به خطی بودن رابطه قطر ممانعت کننده و لگاریتم غلظت داروها اندازه‌گیری قطر نواحی ممانعت کننده برحسب میلی‌متر انجام و با استفاده از آنالیز رگرسیون مبادرت به ترسیم بهترین خط نمودار استاندارد (خط رگرسیون) جهت هر چهار نوع آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش نموده و میزان خطای آن را با استفاد از کنترل تصحیح (قطر ممانعت کنندگی برای نمونه کنترل در حد صفر بوده است) سپس غلظت داروها در سرم و عصاره‌های بافتی محاسبه گردید. برای هر نمودار یک ضریب همبستگی (correlation coefficient) محاسبه گردید که برای تمامی نمودارها در سطح بالایی معنی‌دار و قابل اعتماد بود (r^2 = ۰/۹۷ - ۰/۹۹ و p< ۰/۰۰۱) بود.

۲- ۴- روش کروماتوگرافی لایه نازک توأم با بیواتوگرافی (TLC-B): با توجه به تجربیات انجام شده صفحات سیلیکاژل برای انجام آزمایشهای TLC مناسب تشخیص داده شدند که در حلالهای مخصوص مانند کلرورآمونیوم (جهت اکثر مواد ضدمیکروبی) و حلالی مرکب از (پروپانول، اسیداستیک و آب) برای کینولونها، قابل استفاده بودند. از محاسن صفحات سیلیکاژل می‌توان از سبک بودن، قابل دسترس بودن، سهولت برش، سهولت جابجایی و نگهداری، کم حجم بودن و سرعت بالای حرکت حلال روی آنها را نام برد. محیطهای کشت برای بیواتوگرافی در ظروف پیرکس (به ابعاد ۵×۲۵×۱۷ سانتیمتر) تهیه و آزمایش به‌شرح زیر انجام گردید: ۱- تهیه محیط کشت آگار مولر - هینتون داخل ظروف پیرکس، ۲- کشت باسیلوس سابتیلیس داخل ظروف پیرکس به روش pure plate، ۳- نگهداری ظروف کشت در دمای آزمایشگاه (حدود ۳۰ دقیقه)، ۴- قرار دادن برشهای TLC حاوی عصارهٔ بافتی یا سرم روی محیط کشت و مشخص نمودن خط مبدأ برش و مشخصات نمونه‌برداری روی پلیت (قبلاً عصاره بافتی یا سرم به میزان ۵ میکرولیتر توسط نمونه‌بردار خودکار بر روی خط مبدأ برشهای سیلیکاژل لکه گذاری و داخل تانکهای حاوی حلال صعود کننده قرار گرفته بودند که پس از رسیدن حلال به خط انتها خارج و با سشوار کاملاً خشک شده و بر روی محیط کشت قرار می‌گرفتند). ۵- نگهداری پلیتها در شرایط آزمایشگاه به مدت ۲ ساعت و سپس برداشت برشها در مجاورت شعله و انکوباسیون پلیتها در ۳۷ درجهٔ سانتیگراد به مدت یک شب. ۶- قرائت نتایج و محاسبهٔ قطر نواحی ممانعت کننده (Z) و ضریب جریان R_f که نشان دهندهٔ سبت پیشروی جبههٔ مادهٔ حل شونده (دارو) به جبههٔ حلال می‌باشد (۴ و ۱۷).

۱- ۲- ۳- اندازه‌گیری حداقل مقدار داروی قابل اندازه‌گیری (Minimum Detectable Limit = MDL): به منظور اندازه‌گیری حداقل مقادیر غلظتهای آنتی‌بیوتیک قابل اندازه‌گیری (MDL) در بافتهای ماهی و تعیین میزان حساسیت روش TLC-B به‌روش زیر عمل گردید: ابتدا لکه گذاری رقتها (از رقتهای دارویی در آب مقطر و عصاره بافتی شامل ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای هر دارو (۵μl برای هر برش) و انجام TLC با استفاده از کلرور آمونیوم ۳ درصد به‌عنوان حلال برای داروهای **OTC**، **CTC** و **TMP** و مخلوط پروپانول، اسید استیک و آب مقطر (به حجمهای ۱۰ و ۸ ، ۱) انجام شد، سپس با توجه به نواحی شفاف ایجاد شده در محیط کشت (نواحی ممانعت کننده) در هر یک از رقتهای استاندارد (یا عصاره‌های بافتی) جهت محاسبه حداقل داروی قابل اندازه‌گیری آخرین رقت (هاله ایجاد شده) که مانع رشد میکروارگانیسم شده بود، به عنوان MDL محسوب گردید.

۲- ۲- ۳- ارزیابی امکان تفکیک داروهای ترکیبی در ماهیان درمان شده: همچنان که قبلاً اشاره شد به‌منظور ارزیابی روش TLC-B و امکان تفکیک داروهایی که به‌صورت توأم مصرف می‌شوند، از رژیمهای درمانی بیان شده استفاده گردید و براساس برنامه زمانی مورد اشاره از ماهیان درمان شده نمونه‌گیری به‌عمل آمد. از نمونه‌های به‌عمل آمده به‌روش بیان شده عصاره بافتی تهیه و آزمایش TLC-B به‌عمل آمد. برای هر مقدار درمانی و نمونه بافتی، سه مرتبه آزمایش تکرار گردید.

نتایج

روش میکروبیولوژیک (Bioassay): نتایج مربوط به‌میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیکها در سرم و بافتهای ماهی کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان در جداول ۱ و ۲ آمده است.

۱. حداکثر میزان باقیمانده OTC مصرف شده به روش حمام در کپور به ترتیب ۱/۶μg/ml و ۱۰/۳۳μg/g برای سرم و کلیه بود. در حالی که داروی مذکور در بافتهای کبد و عضله تا ۶۷۴ ساعت (۴ هفته) پس از درمان زیر حداقل رقت قابل اندازه‌گیری (کمتر از ۰/۳μg/ml) بود (جدول ۱).

۲. مصرف OTC به روش خوراکی در قزل‌آلا موجب تولید ۱/۳μg/ml در سرم و ۴/۴۷μg/g در کلیه ماهی نمود، در حالی که غیرقابل اندازه‌گیری (کمتر از ۰/۳μg/ml) در بافتهای کبد و عضله بود (جدول ۲).

۳. مصرف CTC به روش حمام در کپور موجب افزایش جذب آن تا سطح ۱/۲μg/ml در سرم و تا ۰/۴۶μg/g در کلیه ماهی بود، در حالی که در کبد و عضله غیرقابل اندازه‌گیری بود (جدول ۱).

۴. مصرف TMP+SUL در کپور به روش حمام موجب افزایش جذب آن تا سطح ۴/۶۴μg/ml در بافتهای سرم و کلیه ماهی گردید، در حالی که در بافت عضله غیرقابل اندازه‌گیری و در کبد طی ۲۴ ساعت پس از درمان به ۲/۷۸μg/ml رسید (جدول ۱).

۵. مصرف خوراکی FLM در قزل‌آلا موجب جذب آن تا سطح ۲/۳۷μg/ml در سرم، ۳/۱۸μg/g در عضله و ۲/۰۵μg/g در هر یک از بافتهای کبد و کلیه گردید (جدول ۲).

۶. با مصرف FLM به‌روش حمام در کپور، اندازه‌گیری سطح این دارو در هیچ یک از بافتهای این سرم کلیه، کبد و عضله میسر نگردید (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

روش TLC-B

تعیین حداقل مقدار داروی قابل اندازه‌گیری (MDL): همان‌گونه که از نتایج جدول ۳ به دست می‌آید. میزان MDL برحسب μg در مورد داروی کلرتتراسیکلین (CTC) کمترین مقدار و در مورد فلومکوئین (FLM) بیشترین مقدار می‌باشد. مقدار داروی قابل اندازه‌گیری در غلظتهای مشابه در محلول استاندارد بیشتر بوده و تنها در مورد فلومکوئین حساسیت اندازه‌گیری در استاندارد و بافت برابر می‌باشد. مقایسه MDL مربوط به TMP در هر دو محلول استاندارد و عصاره بافتی تقریباً برابر بوده است.

جدول ۱ - نتایج میزان باقیمانده داروها برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر (گرم) سرم و بافتهای کپور معمولی درمان شده به روش حمام به میزان ۲۰۰ قسمت در میلیون در ۲۰ درجهٔ سانتیگراد به مدت یک ساعت.

دارو / نوع بافت / زمان پس از درمان (ساعت)	اکسی تتراسایکلین				کلر تتراسایکلین				سولفادیمیدین +تری متوپریم			
	سرم	کبد	کلیه	عضله	سرم	کبد	کلیه	عضله	سرم	کبد	کلیه	عضله
۴	۰/۵۲	۰	۱۰/۳۳	۰	۱/۲	۰	۰	۰	۴/۶۴	۰	۴/۶۴	۰
۱۲	۱/۶۴	۰	۱۰/۲۳	۰	۰/۳	۰	۰	۰	۱/۲۹	۰	۱/۴۶	۰
۲۴	۱/۰۴	۰	۶/۴۷	۰	۰/۳	۰	۰/۴۶	۰	۰/۵۹	۲/۷۸	۰/۴۶	۰
۴۸	-	-	-	-	۰	-	۰	۰	۰	۰	-	-
۹۶	-	-	-	-	۰	-	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۶۸	۰	۰	۴/۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۳۲۶	۰	۰	۱/۰۴	۰	-	-	-	-	-	-	-	-
۶۷۲	۰	۰	۰/۵۲	۰	-	-	-	-	-	-	-	-

جدول ۲ - نتایج میزان باقیمانده دارو برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر (گرم) سرم و بافتهای قزل‌آلای درمان شده به‌روش خوراکی در ۱۱ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۵ روز

دارو / نوع بافت / زمان پس از درمان (ساعت)	اکسی تتراسایکلین*				فلومکوئین**			
	سرم	کبد	کلیه	عضله	سرم	کبد	کلیه	عضله
۱	۱/۰۳	۰	۳/۲۳	۰	۱/۵۲	-	-	۲/۰۵
۵	۱/۰۳	۰	۴/۴۷	۰	۲/۳۷	۱/۷۶	-	۲/۰۵
۱۲	۱/۳۰	۰	۳/۱۰	۰	۲/۳۷	۲/۰۵	۲/۰۵	۲/۳۷
۲۴	۱/۳۰	۰	۲/۳۰	۰	۲/۰۵	-	-	۳/۱۸
۴۸	۱/۰۳	۰	۲/۳۰	۰	۲/۰۵	۱/۵۲	۱/۵۲	۱/۵۲
۹۶	۰	۰	۱/۶۴	۰	۰	-	۱/۱۴	۰/۹۸

*. به‌میزان ۸۰ میلی‌گرم به‌ازاء کیلوگرم وزن زنده بدن در روز، **. به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازاء کیلوگرم وزن زنده بدن در روز

جدول ۳ - نتایج حداقل غلظت داروی قابل اندازه‌گیری (MDL) به‌روش کروماتوگرافی روی غشاء نازک - بیواتوگرافی (TLC-B)

نوع آنتی‌بیوتیک	MDL محلول استاندارد (μg)	MDL عصاره بافت آغشته به آنتی‌بیوتیک (F.T) (mg)
OTC	۰/۰۶۲۵	۰/۰۶۶۵
CTC	۰/۰۱۵۷	۰/۰۳۱۳۰
TMP	۰/۱۲۵۰	۰/۱۳۳۰
FLM	۰/۲۵	۰/۲۵

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- رابطه میانگین R_f* به‌دست آمده برای ترکیبات استاندارد داروهای اکسی‌تتراسایکلین (OTC) کلرتتراسایکلین (CTC)، فلومکوئین (FLM) و تریمتوپریم (TMP).

نوع دارو	OTC	CTC	FLM	TMP
میانگین R_f	۰/۱۶	۰/۰۹	۰/۶۴	۰/۸۹
میزان پیشروی دارو	کمتر از $\frac{۱}{۴}$ مسیر	کمتر از $\frac{۱}{۴}$ مسیر	حدود $\frac{۲}{۳}$ مسیر	بیشتر از $\frac{۲}{۳}$ مسیر

* ضریب جریان (Rate of flow) ـ نسبت پیشروی جبههٔ مادهٔ حل شونده (دارو) به حلال بر روی کروماتوگرام.

ردیابی باقیمانده داروها در سرم و بافتها به روش TLC-B: به‌طور کلی نتایج ردیابی باقیمانده داروها به روش TLC-B تا حدود زیادی مشابه روش میکروبیولوژیک بوده است با این تفاوت که باقیمانده داروها در این روش بعضاً تا فواصل زمانی طولانی‌تری پس از درمان قابل ردیابی بوده است.

۱. مصرف OTC به‌روش حمام در کپور تا ۴ هفته (۶۷۲ ساعت) پس از درمان در کلیه ماهی قابل ردیابی بوده است (بیشتر از ۰/۰۶$\mu g/g$) در حالی که مصرف CTC و SUL+TMP به روش حمام در کلیه همین ماهی تا ۴۸ ساعت پس از درمان قابل اندازه‌گیری بوده است (بیشتر از ۰/۰۳$\mu g/g$).

۲. مصرف OTC، CTC و SUL+TMP به‌روش حمام در سرم کپور تا ۴۸ ساعت پس از درمان قابل ردیابی بوده است (بیشتر از ۰/۰۶$\mu g/ml$).

۳. مصرف OTC و CTC به‌روش حمام در بافتهای کبد و عضله کپور غیرقابل ردیابی (کمتر از ۰/۰۶-۰/۰۳) ولی مصرف SUL+TMP در کبد آن تا ۴۸ ساعت پس از درمان قابل تعیین (بیشتر از ۰/۱۳$\mu g/g$) و در عضله ماهی غیرقابل اندازه‌گیری بود (کمتر از ۰/۱۳$\mu g/g$).

۴. مصرف FLM به‌روش حمام در بافتهای کپور غیرقابل اندازه‌گیری و ردیابی بوده است (کمتر از ۰/۲۵$\mu g/g$).

۵. مصرف OTC در قزل‌آلا به روش خوراکی در سرم و کلیه ماهی تا ۹۶ ساعت پس از آخرین درمان قابل ردیابی (بیشتر از ۰/۰۶$\mu g/ml(g)$) بوده، در حالی که در بافتهای کبد و عضله غیرقابل تعیین بوده است (کمتر از ۰/۰۶$\mu g/g$).

۶. مصرف FLM در قزل‌آلا به روش خوراکی، در سرم، عضله و کبد تا ۹۶ ساعت و در کلیه تا یک هفته پس از آخرین درمان قابل ردیابی بوده است (بیشتر از ۰/۲۵$\mu g/ml(g)$).

ارزیابی امکان تفکیک داروهای ترکیبی در ماهیان درمان شده: هنگامی که از ترکیبات استاندارد به‌صورت توأم استفاده می‌شود آنتی‌بیوتیکهای هر خانواده براساس R_f خود قابل تفکیک می‌باشند که مشخصه کاملاً خوبی برای ارزیابی و تفکیک آنها می‌باشد. بهرحال مصرف توأم آنتی‌بیوتیکهای یک خانواده (برای مثال OTC و CTC) غیرقابل تفکیک از همدیگر می‌باشند (جدول ۴). در مورد عصاره‌های بافتی:

اولاً: باقیمانده‌های دارویی در عصاره‌های حاصل از بافتهای کبد، عضله و کلیه ماهیان درمان شده به روش تزریقی و با استفاده از مخلوط دو دارو قابل ردیابی نبود.

ثانیاً: در مورد سرم فقط تا ۲۴ ساعت پس از درمان (نمونه‌گیریهای، ۲۴ و ۱۲، ۴ ساعت پس از تزریق) آثار آنتی‌بیوتیکها در محیط TLC-B مشخص گردید که مربوط به یک نوع آنتی‌بیوتیک مشخص بود.

بحث

اغلب اوقات مقایسه نتایج میکروبیولوژیک مربوط به میزان باقی مانده آنتی‌بیوتیکها در ماهیان که توسط افراد مختلف کار شده، کاری دشوار است زیرا این گونه نتایج متأثر از روشهای آزمایش گونه ماهی و شرایط درمانی است. برای مثال میزانهایی از داروهای اکسولینیک اسید و تری‌متوپریم در سرم ماهی آزاد اطلس درمان شده به روش خوراکی و به میزان ۹-۱۰mg/kgb.w. ۱۰mg/kgb.w. در روز به ترتیب به میزانهای ۱/۷ - ۰/۹ و ۱/۲ - ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (۹ و ۱۴). مقادیر ۰/۸$\mu g/ml$ از تری‌متوپریم و ۳/۴$\mu g/ml$ از اکسولینیک اسید به ترتیب در سرم قزل‌آلای رنگین‌کمان درمان شده با میزان ۱۰mg/kgb.w. به مدت یک هفته و ماهی خاردار دریایی (baramaundi) درمان شده به میزان ۱۰mg/kgb.w. به مدت یک هفته گزارش شده است (۲۵). در این مطالعه میزان باقیمانده OTC در کپور به روش حمام (به میزان ppm ۲۰۰ به‌مدت یک ساعت) موجب افزایش سطح دارو در حد ۱/۶۴$\mu g/ml$ در سرم و تا میزان ۱/۳۳$\mu g/g$ در کلیه نمود. در حالی که مصرف CTC به‌روش حمام تنها موجب تولید ۱/۲$\mu g/ml$ از دارو در سرم ۰/۴۶$\mu g/g$ در کلیه ماهی نمود. مصرف خوراکی FLM در قزل‌آلا موجب تولید میزانهای قابل توجه دارو در سرم و سایر بافتها نمود (تا سطح ۲/۳۷$\mu g/ml$ در سرم و عضله ۲/۰۵$\mu g/g$ در کلیه و کبد) در حالی که با مصرف دارو به روش حمام در ماهی کپور غیرقابل اندازه‌گیری بود (غلظت کمتر از ۰/۲۵$\mu g/ml$). به هر حال این گونه روشهای میکروبیولوژیک می‌بایست واجد مشخصاتی از جمله: دقت عمل، سرعت عمل کلینیکی، قابل تکرار بودن و ارزان بودن باشد. اگر چه اخیراً استفاده از روشهای شیمیایی با درجه حساسیت بالا مانند روش HPLC رواج یافته است، لیکن این گونه روشها به علت پیچیدگی، صرف زمان طولانی جهت اجرا، پر هزینه بودن و گاهی غیرقابل تکرار بودن مشکلاتی را به وجود می‌آورد. این‌گونه آنالیزهای فیزیکو - شیمیایی قادر به تعیین میزان باقیمانده داروها از نظر دامنه فعالیت بیولوژیک آنها نمی‌باشند و صرفاً میزانهای باقیمانده داروها را از نقطه نظر شیمیایی تعیین می‌کند (۷). بنابراین علی رغم توسعه این گونه روشهای کاملاً حساس، هنوز نیاز به توسعه و ایجاد روشهای میکروبیولوژیکی ارزان، حساس و سریع برای اندازه‌گیری میزان باقیمانده دارو و فعالیتهای غربالگری آنها می‌باشد (۲۴).

با توجه به مقادیر باقیمانده OTC در سرم و کلیه ماهی کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان (به میزان بیشتر از ۰/۵$\mu g/g(ml)$ در دوز درمانی) استفاده از مقدار درمانی به میزانهای ۲۰۰ppm به‌مدت یک ساعت به‌روش حمام و ۸۰mg/kgb.w. به مدت ۵ روز متوالی به‌روش خوراکی برای کنترل برخی عفونتهای شایع باکتریایی در این گونه‌ها (مانند سپتی ناشی از آئروموناس هایدروفیلا)، منطقی و کافی به‌نظر می‌رسد، زیرا حداقل مقدار ممانعت کننده (Minimum Inhibitory Concentration = MIC) دارو توسط OTC علیه برخی نژادهای این گونه باکتریایی به‌دست آمده از کپور ماهیان پرورشی کمتر از مقادیر باقیمانده در سرم و کلیه ماهی است (MIC<۰/۵$\mu g/ml$، سلطانی، سوابق منتشر نشده) این نتیجه در خصوص مصرف CTC قابل تعمیم نمی‌باشد زیرا باقیمانده این دارو به روش حمام به مراتب کمتر از OTC در سرم و بافتهای همین گونه ماهی بوده است. بنابراین استفاده درمانی از این دارو احتمالاً نتایج درمانی مناسبی را به‌دنبال نخواهد داشت. به هر حال نیاز به آزمایشهای بعدی

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد تا مصرف خوراکی CTC در قزل‌آلا نیز ارزیابی شود.

مصرف SUL+TMP به‌روش حمام(۲۰۰ ppm به مدت یک ساعت) در کپور معمولی نیز موجب تولید میزانهای قابل قبولی از دارو در سرم و کلیه گردید بطوری که می‌توان استفاده از این دارو را در این ماهی و بر علیه عفونتهایی که به این دارو حساس هستند (MIC پایین دارند) توصیه نمود.

مقایسه مصرف خوراکی FLM (۱۰mg.kgb.w.) به مدت ۵ روز) در قزل‌آلا و مصرف حمام آن در کپور (۲۰۰ ppm به مدت یک ساعت) نشان داد که داروی مذکور را می‌توان به روش خوراکی در قزل‌آلا و احتمالاً برخی گونه‌های دیگر پرورشی تجویز نمود، در حالی که مصرف آن به‌روش حمام در کپور و شاید برخی گونه‌های دیگر قابل توصیه نمی‌باشد (جدول ۲). به هر حال برای استاندارد کردن یک مقدار درمانی علاوه بر تعیین میزان باقی مانده داروی مورد نظر در سرم و یا بافتهای حیاتی (مانند کلیه)، می‌بایست از سوابق مربوط به حداقل مقدار ممانعت کننده (MIC) علیه عوامل عفونت زای مورد نظر و نیز اثرات درمانگاهی (Clinical efficacy) نیز با اطلاع بود تا با در نظر گرفتن سه فاکتور مذکور اقدام به استاندارد نمودن مقدار درمانی نمود. از نقطه نظر بهداشت عمومی و ملاحظه مصرف کننده، مصرف OTC و FLM در کپور و قزل‌آلا در ماهیان نزدیک به مرحله بازاری توصیه نمی‌شود زیرا میزان جذب باقیمانده داروهای مذکور در سطح بالایی است (جداول ۱ و ۲).

با توجه به حداقل غلظت دارویی قابل اندازه‌گیری (MDL) به روش TLC-B (جدول ۳) و اندازه‌گیری باقیمانده‌های این داروها در بافتهای کلیه، کبد، عضله و سرم ماهیان (جداول ۱ و ۲)، به نظر می‌رسد که حساسیت این روش مشابه روشهای میکروبیولوژیک بوده است لذا از این روش می‌توان جهت اندازه‌گیری میزان باقیمانده داروهایی نظیر OTC، CTC، FLM، TMP در بافتهای ماهی (عضله) مورد مصرف انسانی استفاده نمود. به هر حال درجه حساسیت این روش (با توجه به نتایج MDL) بیشتر از روش میکروبیولوژیکی است.

به‌کارگیری روش TLC-B برای تفکیک داروهایی که به‌صورت توأم (تزریقی) به مصرف ماهیان رسیده بودند تقریباً غیر کارآمد شناخته شد. مصرف توأم داروها در آب مقطر (جدول ۴) منجر به تفکیک آنها از یکدیگر براساس R_f حاصله در TLC-B گردید در حالی که مصرف توأم این داروها در رژیمهای درمانی به، علت عدم تفکیک نواحی ممانعت کننده حاصله و نهایتاً عدم تفکیک R_fهای ایجاد شده، غیرقابل تفکیک بوده است. علت یا علل احتمالی این امر ناشناخته است و نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

با توجه به نتایج حاصل از روش TLC-B و میکروبیولوژیک جهت تعیین میزان باقیمانده‌های داروهایی نظیر OTC، CTC، TMP و FLM می‌توان نسبت به متداول نمودن این‌گونه روشها جهت فعالیتهای غربالگری برای تعیین میزان باقیمانده برخی آنتی‌بیوتیکها مانند OTC و FLM به‌منظور استاندارد نمودن مقدار درمانی و ملاحظات بهداشت عمومی مصرف کنندگان آبزیان خوراکی نظیر ماهی اقدام نمود، به هر حال مطالعات بیشتری نیاز است‌تا به ارزیابی این گونه روشها در مورد سایر آنتی‌بیوتیکها و گونه‌های ماهی و شرایط مختلف کیفیت آب (هنگام درمان) اقدام نماید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات آقای هادی باقری کارشناس بخش میکروبیولوژی آبزیان به‌خاطر همکاری در انجام آزمایشها، جناب آقای مجید یوسفی واحد سمعی و بصری، آقای فخاری به‌خاطر در اختیار قرار دادن ماهی قزل‌آلا و امکانات کارگاهی، جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی به‌خاطر همکاری در تهیه ماهی کپور، سرکار خانم محقق راد به‌خاطر همکاری در تایپ نتایج، تشکر و قدردانی می‌نماید. پژوهش حاضر با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام گرفته است.

منابع

۱. سلطانی، م. بیماریهای باکتریایی ماهی. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور، صص ۴۳۷-۴۱۵، (۱۳۷۵).

۲. شفیعی، ع. کروماتوگرافی و طیف سنجی، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۱۹۰۶، صص ۳۴-۳، (۱۳۶۸).

۳. مقدس، م. ب. شیمی درمانی بیماریهای باکتریایی در ماهی. پایان‌نامه جهت اخذ دکترای دامپزشکی از دانشگاه تهران، صص ۵۱-۲۳، (۱۳۷۶).

۴. میر زرگر، س. س. ارزیابی باقیمانده برخی آنتی‌بیوتیکها در سرم و بافتهای کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان به روشهای میکروبیولوژیک (bioassay) و کروماتوگرافی لایه نازک توأم با بیواتوگرافی (TLC-B) - پایان‌نامه برای دریافت دکترای تخصصی بهداشت و بیماریهای آبزیان از دانشگاه تهران، به راهنمایی دکتر مهدی سلطانی - شمارهٔ ۸۶، (۱۳۷۸).

5. Ang, C.Y.W., Luo, W., Kiessling. C.R., Mckinn, K., Lochmann, R., Walker, C.C. and Thompson, H.C. A bridging study between liquid chromatography and microbial inhibition assay methods for determining amoxicillin residues in catfish muscle, Journal of A.O.A.C. International 81, 33-39, (1998).

6. Archimbautt, P., Ambroggi, G. and Nicolas, S. Oxolinic acid in the trout. Bioavailability and tissue residues. Ann. Rech. Vet. 19, 39-43, (1988).

7. Bergsjo, T., Nafstad, I. and Ingebrigken, K. The distribution of S-Sulfadiazine and C-trimethoprim in rainbow trout, Acta. Vet. Scand. 20, 25-37, (1979).

8. Cameron, D.E. Tissue levels of trimethoprim in Tasmanian Atlantic salmon in relation to dose and duration of administration. Proceedings of the Saltas Researche Review Seminar, 22 May, Hobant, Australia, pp: 117-126, (1991).

9. Choo, P.S. Oxytetracycline Residues in Muscle of Red Tilapia Medicated Orally and Cultured in Brakish water. Journal of Asian Fisheries Science 10, 75-81, (1997).

10. Crosby, N.T. Determination of Veterinary Residues in Food Ellis Horwood Limited. England. pp: 103-116, (1991).

11. Datta, K. and Das, S.K. Thin layer chromatographie method for rapid quantification and indentification of trimethoprim and sulfamethoxazole in pharmaceutical dosage forms. Journal of Liquid Chromatography 11, 3079-3089, (1998).

12. Grondel, J.C., Noaws, J.F.M., DcJong, M., Schutte, A.R. and Driessens, F. Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio*) following different routes

www.SID.ir

Archive of SID

of adminstration. Journal of Fish Diseases 10, 153-163, (1987).

13. Herbest, D.V. Identification and determination of four β-lactam antibiotics in milk. Journal of Food Protection 45, 450-451, (1982).

14. Hustvedt, S.O., Salte, R. and Vassvik, V. Absorption, distribution and elimination of oxolinic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after various routes of administration, *Aquaculture* 95,193-199, (1991).

15. Jacobsen, M.D. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, (*Salmo gairdneri Richardson*), after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimethoprim. Journal of Fish Diseases 12,29-36, (1998).

16. Kamakura, K., Hsegawa, M. and Tonogai, Y. Detection and determination of tetracyclines in imported frozen shrimp by bioassay and HPLC. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 35, 310-314, (1994).

17. Kondo, F., A simple method of the characteristic differentiation of antibiotics by TLC-bioautography in graded concentration of ammonium chloride. Journal of Food Protection 10, 786-789, (1988).

18. Kusser, W.C. and Newman, S.G. Detection of oxytetracycline residues in fish tissues using a sensitive bioassay, Journal of Fish Diseases 13, 545-548, (1990).

19. Malvisi, J., della-Rocca, G., Anfossi, P. and Giorgetti, G. Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrachus labrax*) after oral adminstration, *Aquaculture* 147, 159-168, (1996).

20. Nagata, T. and Saeki, M. Determination of Ampicillin residues in fish tissues by liquid chromatography. Journal of Association of Official Analytical Chemists 68, 448-450, (1986).

21. Neidert, E., Saschenbrecker, P.W. and Tittiger, F. Thin layer chromatographic/bioautographic method for identification of antibiotic residues in animal tissues. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 70, 2, 197-200, (1987).

22. O'Hara, T.M., Azadpour, A., Scheemaker, J. and Gerard, P.D. Oxytetracycline residues in channel catfish : A feeding trial, J. Vet. Hum. Toxicology 39, 65-70, (1997).

23. Reja, A., Moreno, L., Serrano, J.M., Santiago, D. and Soler, F. Concentration - time profiles of oxytetracycline in blood, kidney and liver of tench (*Tinca tinca*) after intramuscular adminstration. J. Vet. Hum. Toxicology 38, 344-347, (1997).

24. Smith, P., Coyne, R., Vaughan, S., Cazabon, D., Kerry, J. and Hiney, M. The measurement of antibiotic concentrations in the environment; the issue of relevance and accuracy, In : EAFP, 6th Int, Conf. "Diseases of Fish & Shellfish." Book of Abstracts Brest, France, P : 104, (1993).

25. Soltani, S., Shanker, S. and Munday, B.L. Chemotherapy of Cytophaga/Flexibacter-like bacteria (CFLB) infectious in fish : Studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials, Journal of Fish Diseases 18, 555-565, (1995).

26. Ueno, R., Aoki, T. A simplified determination of oxytetracycline in serum and muscle of cultured eel by high-performance liquid chromatography, Journal of Fish Pathology 30, 239-240, (1995).

Assesment of residues of some antibiotics in experimental treatment of common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using microbiological and chromatography-bioautography

Mirzargar , S.S.[1] , Soltani , M.[1] , Rostami, M.[1]

[1]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.*

Microbiological and thin-layer chromatography-bioautography (TLC-B) procedures were undertaken to assess the residues of some chemotherapeutic reagents consisting of oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC), flumequine (FLM) and trimethoprim+ sulphadimidine (TMP+SUL) in the sera and tissues of common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Treatment of carp as a bath (200ppm) and rainbow trout by mouth (80mg.kgb.w.) with OTC resulted in kidney levels of 10μg/g, and 4.4μg/g, respectively, No antibiotic residue of OTC was detectable in both liver and muscle of both species of fish. Treatment of carp as a bath (200ppm) with TMP+SUL resulted in a detectable levels of the drugs in sera and kidney of the fish. Oral treatment (10mg/kgb.w.) of rainbow trout with FLM resulted in the drug levels of 2.37mg/ml, 3.18μg/g and 2.05μg/g in sera, muscle and liver-kidney of fish, respectively whereas no drug level was detectable in the sera and tissues of carp treated as a bath (200ppm). Similar results were obtained using TLC-B procedure. However, using this method the residues of these chemotherapeutic reagents were detectable for a longer period than bioassay tests. Also using TLC-B, a combined treatment (I.P) of these species of fish with the above drugs was not successful for detect the drugs residues.

Key words : Bioautography, Drugs residue, Antibiotic, Sulfonamide, Fish.

www.SID.ir