

## بررسی بقایای آنتی‌بیوتیکی در بافت‌های خوراکی گاوهای کشتاری تبریز به روش FPT

محمدعلی تربتی<sup>۱\*</sup>، مهدی شمشیری<sup>۲</sup>، افشین جوادی<sup>۳</sup>

۱- معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۲- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.

۳- گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: Drtorbati@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۰/۴/۲۴ پذیرش نهایی: ۹۰/۴/۲۸)

### چکیده

وجود بقایای آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی و انتقال آن به بدن مصرف‌کنندگان باعث ایجاد عوارضی نظیر مقاومت‌های باکتریایی، واکنش‌های آلرژیک، مسمومیت، سرطان‌زایی و به هم زدن میکروفلور طبیعی روده می‌شود. روش چهار پلیتی یکی از روش‌های میکروبیولوژیکی جهت تأیید حضور بقایای آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی می‌باشد که در چهار محیط کشت با pH و باکتری‌های متفاوت انجام می‌گیرد. در این مطالعه از ۳۰ لاشه گاوهای کشتار شده در کشتارگاه تبریز نمونه‌هایی از عضله کپل، دیافراگم و بافت کبد و کلیه به صورت تصادفی اخذ شد. از بین نمونه‌های کلیه، ۳۰ مورد (۱۰۰٪)؛ از نمونه کبد، ۲۸ مورد (۹۳/۳۳٪)؛ از عضله دیافراگم، ۲۲ مورد (۷۳/۳۳٪) و از نمونه عضله کپل، ۲۲ مورد (۷۳/۳۳٪) آلوده به بقایای آنتی‌بیوتیکی تشخیص داده شدند. با بررسی نتایج مشخص گردید بیشترین بقایای آنتی‌بیوتیکی مربوط به گروه‌های پنی‌سیلین و ماکرولیدها بوده است ( $P < 0.05$ ). در ضمن بافت کلیه به‌عنوان آلوده‌ترین بافت به بقایای آنتی‌بیوتیکی تشخیص داده شد ( $P < 0.05$ ).

واژه‌های کلیدی: باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی، بافت‌های خوراکی، گاو، FPT، کشتارگاه تبریز

### مقدمه

و مقابله با این‌گونه عفونت‌ها پدیدار گشت و به مرور زمان انواع و اقسام آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان عفونت‌ها تولید و به کار برده شدند. اولین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپزشکی از حدود ۴۰ سال پیش با مجوز FDA (Food and Drug Administration) در ایالات متحده جهت درمان و مدیریت عفونت‌های

قبل از قرن بیستم بسیاری از مرگ و میرهای بیمارستانی در اثر عفونت زخم‌ها یا پس از اعمال جراحی در اثر ورود باکتری‌های پاتوژن به این زخم‌ها و عفونت ایجادشده توسط آنها روی می‌داد. با کشف پنی‌سیلین در سال ۱۹۲۸ میلادی توسط Alexander Fleming امیدهای تازه‌ای جهت برخورد

غذایی از نظر عاری بودن از آنتی‌بیوتیک‌ها امری لازم و ضروری می‌باشد. در بین انواع روش‌های مختلف تشخیص بقایای آنتی‌بیوتیکی، روش‌های میکروبیولوژیکی از متداول‌ترین و کاربردی‌ترین روش‌های تعیین بقایای آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی هستند؛ زیرا این روش‌ها در مقایسه با دیگر روش‌ها از نظر هزینه و زمان و حساسیت تشخیصی به صرفه‌تر می‌باشند (Botsoglou, 2001; Afshar, 2000).

روش F.P.T. (Four Plate Test) که در این مقاله از آن استفاده شده است، در سال‌های اخیر توسط برخی محققین استفاده شده و حساسیت آن جهت تأیید بقایای آنتی‌بیوتیکی مورد تأیید قرار گرفته و امروزه به‌عنوان روش استاندارد تأیید بقایای آنتی‌بیوتیکی در اتحادیه اروپا کاربرد دارد (Hossein Khan Nazer, 1999).

تست چهارپلیتی ذاتاً توانایی شناسایی پنج گروه مختلف از آنتی‌بیوتیک‌ها شامل بتالاکتام‌ها، تتراسیکلین‌ها، سولفونامیدها، آمینوگلیکوزیدها و ماکرولیدها را دارد (Koenen-Dierick, et al., 1995; Nolan, et al., 2000). این توانایی تشخیص بر اساس نوع محیط کشت و باکتری استفاده شده در آن می‌باشد که خلاصه آن در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: محیط کشت، باکتری‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های احتمالی قابل‌شناسایی در تست چهار پلیت استفاده شده در اروپا (Myllyniemi, et al., 2002)

pH محیط کشت آگار	باکتری تست	آنتی‌بیوتیک‌های دخیل
۶/۰	باسیلوس سوبتیلیس	گروه پنی‌سیلین‌ها گروه تتراسیکلین‌ها
۷/۲	باسیلوس سوبتیلیس	داروهای سولفونامیدی
۸/۰	باسیلوس سوبتیلیس	گروه آمینوگلیکوزیدها
۸/۰	میکروکوکوس لوتئوس	گروه پنی‌سیلین‌ها گروه ماکرولیدها

دام به‌کار گرفته شد (Mithcell, 1993). به گزارش FDA حدود ۸۷٪ مصارف آنتی‌بیوتیکی در دام‌ها جهت درمان و کنترل عفونت‌ها و ۱۳٪ آن جهت مصارف تغذیه‌ای و به‌عنوان مکمل غذایی کاربرد دارد (Mithcell, 1993).

به‌علت کارایی بالایی که آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان و پیشگیری بیماری‌ها دارند، متأسفانه انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها بدون در نظر گرفتن عوارض جانبی دارو و دوره دفع دارویی، علاوه بر دامپزشکان، توسط تکنسین‌های دامپزشکی و حتی خود دامداران مورد استفاده قرار می‌گیرند (Hossein Khan Nazer, 1999). علیرغم اثرات مفید این داروها در درمان بیماری‌های دام و افزایش وزن بدن دام‌ها، اثرات سوء آنها نیز ممکن است باعث ایجاد عوارض زیان‌باری چه در دام‌ها و چه در انسان شود (Hossein Khan Nazer, 1999).

وجود بقایای آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی به‌خصوص گوشت و انتقال آن به بدن مصرف‌کنندگان یکی از این اثرات مهم زیان‌بخش می‌باشد. این امر باعث ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها، واکنش‌های آلرژیک در افراد حساس، خطرات مسمومیت مستقیم با این داروها، خواص کارسینوژنیک برخی از آنها و همچنین به‌هم زدن میکروفلور طبیعی بدن می‌شود (Berends, 2001; Hossein Khan Nazer, 1999).

از آنجایی که مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای جهان سوم و به‌خصوص ایران بی‌رویه می‌باشد و به‌دوره دفع آنتی‌بیوتیک از بدن دام‌ها توجهی نمی‌شود، این مسأله حادث‌تر می‌باشد. لذا کنترل کیفی فرآورده‌های

استیک و هیدروکسید سدیم به صورت ۶، ۷/۲ و ۸ تنظیم گردید. ترکیب به دست آمده در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شد.

پس از آماده سازی پلیت‌ها، طبق دستورالعمل روش چهار پلیت، باکتری باسیلوس سوبتیلیس در سه pH شامل ۶، ۷/۲ و ۸ و باکتری میکروکوکوس لوتئوس در  $pH = 8$  با استفاده از سواب پنبه‌ای و رعایت شرایط استریل در سطح پلیت‌ها کشت داده شدند (Botsoglou and Fletouris, 2001).

جهت حصول اطمینان از حساسیت باکتری‌های مورد استفاده در انجام آزمایش تعداد ۹ عدد دیسک آنتی‌بیوگرام مختلف به عنوان نمونه‌های شاهد مثبت در هریک از پلیت‌ها با pH‌های مختلف قرار داده شدند.

نمونه‌های منجمد شده (عضله کپل، عضله دیافراگم، کلیه و کبد)، با استفاده از تیغ شماره ۷ ست بیوپسی به صورت استوانه‌ای بریده شده و سپس با استفاده از اسکالپل قطعاتی از نمونه مربوطه به صورت دیسک‌هایی با ضخامت ۲ میلی‌متر برش داده شدند. نمونه‌های به دست آمده طبق الگوی نشان داده شده در شکل ۲-۵ در چهار pH مختلف تحت آزمایش قرار گرفتند. پس از آن بر روی هر کدام از پلیت‌ها برجسیبی شامل نام باکتری تست، pH محیط، نام ارگان مورد نظر و شماره‌های نمونه نصب گردید.

در ادامه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پلیت‌های

در این راستا هدف از این تحقیق شناسایی گوشت و احشاء خوراکی (کبد و کلیه) آلوده به بقایای آنتی‌بیوتیکی، بررسی وضعیت آلودگی گوشت و احشاء آلوده به آنتی‌بیوتیک عرضه شده به بازار و در نهایت مشخص نمودن رایج‌ترین گروه آنتی‌بیوتیکی باقی‌مانده در مواد غذایی می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از تعداد ۳۰ لاشه در فاصله زمانی پاییز ۸۲ تا بهار سال ۱۳۸۳ از لاشه‌های گاوهای کشتاری کشتارگاه تبریز به عمل آمد. محل‌های نمونه برداری شامل عضله کپل، عضله دیافراگم، کلیه و کبد و حداقل میزان نمونه برداشته شده ۲۰ گرم بود. نمونه‌ها پس از ثبت مشخصات، در ظروف پلی‌اتیلنی در پوش دار استریل قرار داده شده و پس از ثبت کد بر روی آنها، تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در دمای  $-70^{\circ}C$  درجه سلسیوس منجمد گردیدند (Afshar, 2000b).

باکتری‌های مورد استفاده در روش چهار پلیت شامل باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus Subtilis*) با کد PTCC 1365 و میکروکوکوس لوتئوس (*Micrococcus Luteus*) با کد PTCC 1169 می‌باشد. این باکتری‌ها جهت استفاده در محیط نوترینت آگار مورد کشت قرار گرفتند. پس از تکثیر باکتری‌ها به میزان مورد نیاز، سوسپانسیون از آنها در محیط نوترینت برات تهیه گردید (Anonymous, 1992).

محیط کشت مورد استفاده در روش چهار پلیت مولر هینتون آگار می‌باشد. pH محیط جوشانده شده با استفاده از pH متر دیجیتالی به وسیله اسید

آنتی‌بیوتیکی در نظر گرفته شد. تعداد و درصد موارد مثبت به تفکیک بافت و pH در جدول ۲ خلاصه شده است.

از مجموع ۳۰ نمونه کلیه، ۳۰ مورد (۱۰۰٪)، از مجموع ۳۰ نمونه کبد، ۲۸ مورد (۹۳/۳۳٪)، از مجموع ۳۰ نمونه دیافراگم، ۲۲ مورد (۷۳/۳۳٪) و از مجموع ۳۰ نمونه عضله کپل، ۲۲ مورد (۷۳/۳۳٪) دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی بودند، در این میان بافت کلیه به‌عنوان آلوده‌ترین بافت به بقایای آنتی‌بیوتیکی تشخیص داده شد ( $P < 0.05$ ) ( نمودار ۱).

از مجموع ۴۸۰ نمونه مورد آزمایش ۱۸۸ نمونه مثبت ارزیابی گردید که ۸۷ مورد با استفاده از باسیلوس سوبتیلیس و ۱۰۱ مورد با به‌کارگیری میکروکوکوس لوتئوس مشخص گردید لذا بالاترین آلودگی آنتی‌بیوتیکی مربوط به گروه پنی‌سیلین‌ها و ماکرولیدها می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

حاوی باکتری میکروکوکوس لوتئوس به‌علت رشد بطئی این باکتری به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه‌شده و سپس نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از کولیس دیجیتال قرائت گردید.

نتایج به‌دست‌آمده از انجام آزمایش توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

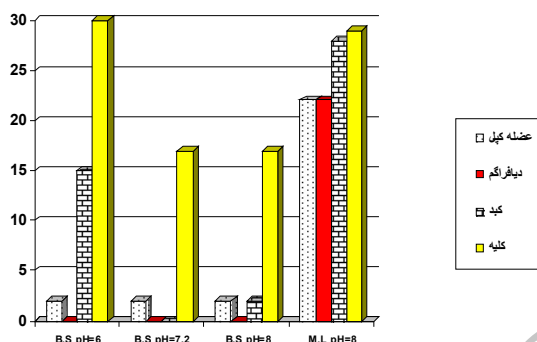
### یافته‌ها

با توجه به مطالعات صورت‌گرفته، هاله عدم رشد در تست چهار پلیتی فقط زمانی مشاهده می‌گردد که بقایای آنتی‌بیوتیکی بیش از حد مجاز باشد. زیرا حساسیت این تست طوری است که قادر به شناسایی بقایای آنتی‌بیوتیکی کمتر و یا در حد مقدار مجاز نمی‌باشد (Hossein Khan Nazer 1995; Hossein Khan Nazer, 1999).

لذا ایجاد هاله در اطراف نمونه، در هر یک از pHها به‌عنوان نتیجه مثبت، یعنی آلودگی نمونه به بقایای

جدول ۲: نتایج حاصل از آزمایش نمونه‌ها به تفکیک بافت، باکتری استفاده‌شده و pH محیط کشت به‌صورت فراوانی مطلق و نسبی

م. لوتئوس	باسیلوس سوبتیلیس			باکتری تست	
	۸	۷/۲	۶	pH محیط کشت	تعداد نمونه
	فراوانی مطلق و نسبی موارد مثبت			بافت	
۲۲	۲	۲	۲	۳۰	عضله کپل
(۷۳/۳۳٪)	(۶/۶۶٪)	(۶/۶۶٪)	(۶/۶۶٪)		
۲۲	۰	۰	۰	۳۰	دیافراگم
(۷۳/۳۳٪)	(۰٪)	(۰٪)	(۰٪)		
۲۸	۲	۰	۱۵	۳۰	کبد
(۹۳/۳۳٪)	(۶/۶۶٪)	(۰٪)	(۵۰٪)		
۲۹	۱۷	۱۷	۳۰	۳۰	کلیه
(۹۶/۶۶٪)	(۵۶/۶۶٪)	(۵۶/۶۶٪)	(۱۰۰٪)		
۱۰۱	۲۱	۱۹	۴۷	۱۲۰	جمع
(۸۴/۱۶٪)	(۱۷/۵٪)	(۱۵/۸۳٪)	(۳۹/۱۶٪)		



نمودار ۱: نمودار مقایسه موارد مثبت بر اساس بافت و pH محیط کشت

## بحث و نتیجه گیری

در بررسی بقایای دارویی هر گونه تست میکروبی کارآمد می‌تواند به‌عنوان یک غربال اولیه جهت تأیید وجود دامنه وسیعی از موادی که مانع رشد میکروارگانیسم می‌شوند، به‌کار رود. برخی اطلاعات به‌دست‌آمده در این تست‌ها می‌تواند نقش مثبتی در تأیید نوع آنتی‌بیوتیک موجود با استفاده از آنالیز مجدد نمونه با روش‌های میکروبی دیگر نظیر روش «سه پلیتی»، «شش پلیتی»، «تست باسیلوس سوبتیلیس آلمانی» (German Bacillus Subtilis test) و «تست چهار پلیت اروپایی» (EC four-plate test) که توانایی تفریق بین گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی را دارند داشته باشند. این تست‌های غربالی می‌توانند فرضیاتی را در مورد نوع بقایای دارویی در نمونه‌ها به‌دست دهند، اما توانایی شناسایی آنتی‌بیوتیک خاصی را ندارند (Botsoglou and Fletouris, 2001).

با توجه به این‌که تمام داروهای دامی و یا متابولیت‌های حاصل از آنها فعالیت ضدباکتریایی نشان نمی‌دهند،

روش غربالی اولین قدم در بررسی نمونه‌ها جهت اثبات وجود یا عدم بقایای دارویی است. این روش بایستی ارزان بوده، قابلیت انجام با تعداد بالای نمونه‌ها، دارا بودن حداقل نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب، مثبت بودن برای تمام نمونه‌های حاوی بقایا در سطح MRL (حداکثر میزان باقی‌مانده) را داشته باشد (Myllyniemi, et al., 2004).

امروزه هنوز تست‌های میکروبیولوژیکی بیشترین استفاده را در غربالگری نمونه‌های غذایی در سطح کلان دارند. زیرا این تست‌ها به آسانی قابل اجرا بوده و نسبت به هزینه‌های مصرف‌شده، توانایی شناسایی چندین نوع باقی‌مانده دارویی با ساختارهای شیمیایی متفاوت را دارند. این عمل باعث کاهش تعداد نمونه‌های ارسالی به آزمایش‌های تکمیلی می‌شود. ولی باید توجه داشت که این تست‌ها بایستی به‌نحوی تنظیم شوند که حداقل منفی کاذب را داشته باشند (Botsoglou and Fletouris, 2001).

احتمال تأثیر ترکیب محیط کشت، و طبیعت آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش بر روی نتایج حاصله زیاد است (Botsoglou and Fletouris, 2001).

در مطالعات اخیر در مورد تأثیر محیط کشت بر شناسایی ترکیباتی نظیر سفتی‌فورها، سولفونامیدها، استرپتومایسین و برخی ماکرولیدها مشخص شده است که در تماس مستقیم نمونه گوشت و محیط کشت به‌صورتی که در روش چهارپلیتی انجام می‌گیرد، هیچ تضمینی برای شناسایی این آنتی‌بیوتیک‌ها وجود ندارد (Okerman, et al., 1998a; Okerman, et al., 1998b; Botsoglou and Fletouris, 2001)

در مطالعه دیگری بر روی تست چهارپلیتی، دو پلیت از این سیستم جهت غربالگری سولفامتازین و استرپتومایسین مناسب تشخیص داده نشد. پلیت سوم تتراسایکلین‌ها را در مقادیر بالای MRL شناسایی می‌کرد ولی پلیت چهارم به بتالاکتام‌ها و برخی ماکرولیدها حساس بود (Botsoglou and Fletouris, 2001; Gaudin, et al., 2004).

شناسایی فلوروکینولون‌ها، انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین تنها با یک پلیت اضافی شامل ای-کولای قابل شناسایی بودند که تست چهارپلیتی فاقد این پلیت است (Hrdlicka, 1990; Myllyniemi, 2004; Botsoglou and Fletouris, 2001)

استفاده از روش‌های میکروبیولوژیکی در بررسی بقایای سولفونامیدی در مواد غذایی بسیار ارزشمند است. تعیین وجود یا عدم وجود بقایای سولفونامیدی در مقادیر زیر MRL کاملاً وابسته به حساسیت تست می‌باشد. محققین زیادی حساسیت روش چهارپلیتی را در مورد بقایای

روش‌های ایمونوشیمیایی (Immunochemical assays) نیز جهت اهداف غربالگری مورد استفاده قرار می‌گیرند. همانند روش‌های میکروبی، تست‌های ایمونوشیمیایی اگرچه بسیار حساس هستند، ولی نمی‌توانند از نظر نظارتی به‌عنوان یک تست قطعی در نظر گرفته شوند؛ زیرا ایجاد نتایج مثبت کاذب در آنها بالاست. به این علت این تست‌ها به‌عنوان مکمل و در قالب یک سیستم آنالیزی مرکب از روش‌های مختلف به‌کار می‌روند. این تست‌ها می‌توانند جهت تعیین نوع آنتی‌بیوتیک در گروه تشخیص داده شده توسط تست‌های میکروبی به‌کار روند (Botsoglou and Fletouris, 2001).

طبق مطالعات انجام‌یافته مشاهده هاله مهاری در اطراف نمونه‌ها در روش چهار پلیتی تنها زمانی امکان‌پذیر است که میزان بقایای آنتی‌بیوتیک بیش از حد مجاز باشد. زیرا حساسیت این تست طوری است که بقایای کمتر و یا در حد مجاز را نمی‌تواند تشخیص بدهد (Hossein Khan Nazer, 1999; Myllyniemi, et al., 2001).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در اجرای این تحقیق، مشخص گردید که استفاده از باکتری میکروکوکوس لوتئوس در pH=8 بیشترین نتایج را به‌همراه داشته است. بنابراین تغییر pH محیط کشت و نوع باکتری بیشترین تأثیر را بر روی آشکارسازی اثرات مهاری آنتی‌بیوتیک‌ها دارا می‌باشد.

بررسی‌هایی که قبلاً بر روی روش چهار پلیتی انجام شده است گویای این مطلب است که این تست نسبتاً حساس بوده و به آسانی قابل استاندارد کردن می‌باشد، ولی درعین حال وقت‌گیر و نسبتاً هزینه‌بر بوده و

Smither, et .Botsoglou and Fletouris, 2001)

(al., 1980; Tsai and Kondo, 2001

بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق بیشترین آلودگی به آنتی بیوتیک به ترتیب در کلیه، کبد و عضلات دیده می شود. این نتایج با یافته های «بگی» و همکاران در سال ۱۹۹۴ که بافت های جوجه را از نظر بقایای تتراسایکلین با Delvotest بررسی کردند مطابقت دارد. در این مطالعه مشخص گردید که اکسی تتراسایکلین در بافت کلیه تجمع می یابد و اگر بافت کلیه در یک آزمایش منفی بود، عضلات نیز عملاً منفی بودند (Hossein Khan Nazer, 1999; Koenen-Dierick and De Beer, 1998; Myllyniemi, et al., 2002).

با توجه به جدول ۱ و نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان نتیجه گرفت که عمده آلودگی بافت های خوراکی به آنتی بیوتیک در گاوها شامل گروه پنی سیلین ها و ماکرولیدها می باشد که این امر با مطالعات قبلی و واقعیت های موجود در سطح دامداری های کشور مطابقت دارد (Botsoglou and Fletouris, 2001).

پیشنهاد می گردد در بررسی های بعدی از غشاهای سلولزی جهت بررسی وجود یا عدم نتایج مثبت کاذب استفاده شود.

همچنین نسبت به جایگزینی برخی باکتری های مورد استفاده در تست از قبیل اشیریشیا کولای که امروزه به عنوان تست چهارپلیت تغییر شکل یافته MFPT (Modified Four-Plate Test) نامیده می شود، اقدام شود.

سولفونامیدی بررسی کرده اند و در این میان روش چهارپلیتی موفق به تشخیص بقایای سولفادیمیدین گردیده است؛ ولی حساسیت آن در مقادیر بالای MRL بوده است (Currie, et al., 1998; Khan Nazer, 2004).

در مطالعه دیگری جهت مقایسه روش های مختلف شناسایی بقایای پنی سیلین در مواد غذایی، در میان روش های میکروبیولوژیکی تنها نتایج روش چهارپلیتی با HPLC قابل مقایسه بود (Jevinova, et al., 2003; popelka, et al., 2003).

طبق گزارش حسین خان ناظر، حساسیت تست چهارپلیتی، ۲/۵ برابر سایر تست های میکروبی برآورد شده است (Hossein Khan Nazer, 1995; Hossein Khan Nazer, 1999).

بر اساس گزارش های موجود، در سال ۱۹۹۵ تعداد ۳۴۰۰۰ نمونه کلیه جهت بررسی بقایای آنتی بیوتیکی شامل پنی سیلین، تتراسایکلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل و سولفونامیدها به آزمایشگاه های ایالتی در انگلستان ارسال شده بود و زمان مورد نیاز جهت پاسخ گویی، ۲۸ روز پس از پذیرش نمونه ها بود. با اتخاذ روش غربالی «چهارپلیتی» و در ادامه استفاده از الایزا (ELISA) و استفاده از روش کروماتوگرافی مایع LC (Liquid chromatography) جهت تعیین نوع آنتی بیوتیک، تراکم اولیه نمونه ها از ۳۴۰۰۰ نمونه تنها به ۱۷۰ نمونه کاهش یافت. علت انتخاب روش «چهارپلیتی»، ارزان بودن، توان عملیاتی بالا در برخورد با مقادیر انبوه نمونه ها و عدم نیاز به مهارت بالای اپراتور بود

**سپاسگزاری**

صنعتی دام تبریز و نیز دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز سپاسگزاری گردد.

جا دارد از همکاری‌های صمیمانه اداره کل دامپزشکی استان آذربایجان شرقی و کشتارگاه

**منابع**

- Afshar, K. (2000a). Control instruction for veterinary drugs usage. Institute of Standard and Industrial Research of Iran, No 5592, pp. 1-12.
- Afshar, K. (2000b). Sampling method for control of veterinary drugs residues in red meat, poultry meat and theirs products. Institute of Standard and Industrial Research of Iran, 5659: 1-24.
- Andrew, S.M., Frobish, R.A. and Paapee, M.J. (1997). Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false positive outcomes, *Journal of Dairy Science*, 80: 3050-3057.
- Anonymous (1992). Practical microbiology guideline. Merk's trading publishing, pp. 1-15.
- Berends, B.R., Van den Bogaard, A.E., van Knapen, F. and Sniijders, J.M. (2001). Human health hazards associated with the administration of antimicrobials to slaughter animals, *Veterinary Quarterly*, 23(1): 2-10.
- Botsoglou, N.A. and Fletouris, D.J. (2001). Drug residue in foods, New York, Marcel Dekker, pp. 456-572.
- Chui-shiang, C., Tung-fa, T. and Hui-ping, L. (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. and McCaughey, W.J. (1998). Evaluation of a modified EC Four Plate Method to detect antimicrobial drugs. *Food Additives and Contaminants*, 15(6): 651-660.
- Gaudin, V., Maris, P., Fuselier, R., Ribouchon, J.L., Cadieu, N. and Rault, A. (2004). Validation of a microbiological method : the STAR protocol, a five-plate test , for the screening of antibiotic residue in milk. *Food Additives and Contaminants*, 21(8): 422-423.
- Hossein Khan Nazer, A. and Kahba, H. (1999). Antibiotics residues and sulfonamides in poultry by FPT method and effect of heating on them. *Pazhooresh and Sazandegi Journal*, 43: 62-65.
- Hossein Khan Nazer, A., Shakar foroush, S. and Ghanei, K. (1995). FPT method application for determination of antibiotics residues in sheep carcasses. *Pazhooresh and Sazandegi Journal*, 38: 180-184.
- Hrdlicka, J. (1990). Residues of inhibitory agents in the tissue of slaughter-house animal-comparison of microbiological methods of agar diffusion. *Veterinary Medicine*, 35(7): 411-418.
- Hossein Khan Nazer, A. (2004). Experimental design for he microbiological four-plate test for the detection of sulphadimidine residues at the levels of concern. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48: 403-407.
- Jevinova, P., Dudrikova, E. and Sokol, J. (2003). Determination of oxytetracycline residues in milk with the use of HPLC method and two microbial inhibition assays. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 47: 211-216.
- Koenen-Dierick, K. and De Beer, J.O. (1998). Optimization of an antibiotic residue screening test , based on inhibition of *Bacillus subtilis* BGA, with experimental design. *Food Additives and Contaminants*, 15(5): 528-534.
- Koenen-Dierick, K., Okerman, L., De Zutter, L., Degroot, J.M., Van Hoof, J. and 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 and Contaminants*, 12(1): 77-82.



- Mithcell, G.A. (1993). Current status of dairy drug residues, Proceeding of ASAS Dairy Symposium, pp. 1-10
- Myllyniemi, A.L., Nuotio, L., Lindfors, E., Rannikko, R., Niemi, A. and Backman, C. (2001). A microbiological six-plate method for identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples, *Analyst*, 126: 641-646.
- Myllyniemi, A.L., Rannikko, R., Lindfors, E., Niemi, A. and Backman, C. (2000). Microbiological and chemical detection of incurred penicillin G, oxytetracycline, enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bovine and porcine tissues. *Food Additives and Contaminants*, 17(12): 991-1000.
- Myllyniemi, A.L. (2004). Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat, Academic dissertation, Faculty of veterinary medicine, University of Helsinki, pp. 11-38.
- Myllyniemi, A.L., Siplila, H., Nuotio, L., Niemi, A. and Honkanen-Buzalski, T. (2002). An indirect conductimetric screening method for the detection of antibiotic residues in bovine kidneys. *Analyst*, 127(9): 1247-1251.
- Nolan, M., Dooley, M., Nugent, A. and O'Keeffe, M. (2000). Antibiotic residue testing in kidney : comparison of a modified one-plate test with the EC four-plate test and the Charm II test, The national food center, Ireland, pp. 561-582.
- Okerman, L., De Wasch, K. and Van Hoof, J. (1998a). Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix. *Analyst*, 123(11): 2361-2365.
- Okerman, L., Van Hoof, J. and Debeuckelaere, W. (1998b). 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.
- popelka, P., Nagy, J. and Sokol, J. (2003). Comparison of various methods for penicillin residue detection in cow milk after intramammary and parenteral treatment, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 47: 203-209.
- Smither, R., Lott, A.F., Dalziel, R.W. and Ostler, D.C. (1980). Antibiotic residues in meat in the United Kingdom; an assessment of specific test to detect and identify antibiotic residues, *Journal of Hygiene*, 85(3): 359-369.
- Tsai, C.E. and Kondo, F. (2001). Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents. *Journal of Food Protection*, 64(3): 361-366.