نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ٤٦- ٥٥

بررسی بقایای آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در تخم‌مرغ‌های تجاری به روش الایزا

حدیثه ثناخوان رضاییه[۱]، لیلا مدیری*[۱]، آرش چایچی نصرتی[۱]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی،لاهیجان، ایران.

دریافت مقاله: ۳۱ مرداد ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۵ آبان ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۵ آبان ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2024.474638.1252

چکیده

فورازولیدون، آنتی‌بیوتیکی از خانواده نیتروفوران‌هاست که خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارد و معمولاً برای درمان عفونت‌های باکتریایی مانند آنتریت و گاستروانتریت استفاده می‌شود. همچنین، این دارو به‌عنوان افزودنی خوراکی و محرک رشد در صنعت طیور به کار می‌رود. با این حال، به‌دلیل عوارض جانبی سمی و خطر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده از نیتروفوران‌ها در پرورش طیور در ایران ممنوع است. لذا این مطالعه به بررسی باقی‌مانده متابولیت فورازولیدون (AOZ) در تخم‌مرغ‌های مارک‌دار خریداری‌شده در استان گیلان پرداخته است. در مطالعه حاضر تعداد ۶۴۶ عدد تخم‌مرغ تجاری در سه مرحله از فروشگاه‌های مختلف سطح استان گیلان به‌صورت تصادفی خریداری و جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با استفاده از کیت RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) Art. No. R3703 برای ارزیابی متابولیت آنتی‌بیوتیک فورازولیدون (AOZ) مورد آزمایش قرار گرفتند. در نهایت نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۵ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. در میان ۶۴۶ نمونه تخم‌مرغ جمع‌آوری شده، تعداد ۴۱۲ نمونه معادل ۶۳/۸ درصد به آنتی‌بیوتیک فورازولیدون آلوده بودند. میانگین باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در میان کلیه نمونه‌ها ۱۱۹/۰۴ نانوگرم بر کیلوگرم و کمترین و بیشترین مقادیر شناسایی شده به‌ترتیب ۳۹/۰۶ و ۷۴۹/۱ نانوگرم بر کیلوگرم بود. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده وجود باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در نمونه‌های تخم‌مرغ است که با توجه به خطرات وجود باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی در تخم‌مرغ و ممنوعیت استفاده از فورازولیدون در پرورش طیور، نظارت منظم بر صنعت پرورش طیور ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک، فورازولیدون، AOZ، الایزا، تخم‌مرغ*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: Leim_clinpathem@yahoo.com

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیبات طبیعی، نیمه‌سنتری یا مصنوعی با فعالیت ضد میکروبی هستند، که از پرمصرف‌ترین داروها در صنعت طیور می‌باشند (۱). این داروها معمولاً برای مقاصد درمانی، پیشگیری و بهبود رشد مورد استفاده قرار می‌گیرند، با این‌حال یکی از ایرادات استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها تجمع باقیمانده آنها در بافت‌ها و قسمت‌های خوراکی حیوانات است که در نهایت بخشی از هرم غذایی می‌شوند (۲). وجود بقایای آنتی‌بیوتیک در حیوانات غذایی بیشتر از حد مجاز حداکثر باقی‌مانده، ممکن است به ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حیوانات یا انسان منجر شود، که این امر منجر به شکست درمان و ضررهای اقتصادی شده و همچنین می‌تواند به‌عنوان منبع انتقال ژن به انسان عمل کند. علاوه بر این مصرف مقادیر کم آنتی‌بیوتیک‌ها توسط انسان برای طولانی‌مدت می‌تواند منجر به آلرژی، سرطان‌زایی و اثرات مضر بالقوه بر میکروفلور روده انسان شود (۳).

فورازولیدون (۵- نیتروفورفوریلیدین‌آمین)-۲- اکسازولیدینون، FZD) یک عامل ضد میکروبی سنتزی از خانواده نیتروفوران‌ها است که به‌طور گسترده‌ای در دامپزشکی برای درمان عفونت‌های ناشی از *اشریشیاکلی*، *سالمونلا* و *شیگلا* و همچنین برای افزایش تولید دام، به‌ویژه در خوک‌ها، مرغ‌ها و ماهی‌ها استفاده می‌شود(۴، ۵). در سال ۱۹۹۵، استفاده از فورازولیدون و سایر نیتروفوران‌ها برای تولید دام در اتحادیه اروپا به‌دلیل نگرانی در مورد عوارض جانبی سمی، جهش‌زایی یا سرطان‌زایی بر سلامت انسان و امکان ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممنوع شد (۶). با توجه به نتایج JECFA بر اساس اطلاعات علمی موجود، هیچ سطح ایمنی از باقیمانده‌های فورازولیدون یا متابولیت‌های آن در مواد غذایی با خطر قابل قبولی برای مصرف‌کنندگان وجود ندارد. به همین دلیل، مقامات ذی‌صلاح باید از باقی‌ماندن فورازولیدون در مواد غذایی جلوگیری کنند. به همین دلیل در حال حاضر، استفاده از نیتروفوران‌ها در حیوانات تولیدکننده غذا در اتحادیه اروپا منع شده است و در فهرست "مواد ممنوعه" قرار می‌گیرند که برای آنها MRL (حداکثر حد باقیمانده) نمی‌توان تعیین کرد.

برای کنترل استفاده غیر قانونی از نیتروفوران‌ها و جلوگیری از رسیدن آن به مصرف‌کننده، مقامات اقدامات خاصی را انجام داده‌اند که شامل نظارت بر مواد غذایی با منشاء حیوانی است. در حالی که نیتروفوران‌ها به سرعت داخل بدن متابولیزه می‌شوند، متابولیت‌های آنها در ترکیب با پروتئین‌ها پایدار بوده و می‌توانند برای طولانی‌مدت در بافت‌های بیولوژیکی باقی بمانند. از این‌رو متابولیت‌های نیتروفوران‌ها معمولاً به‌عنوان مارکرهای باقیمانده دارو برای تشخیص این دسته از داروها استفاده می‌شود (۷، ۸).

AOZ (3-amino-2-oxazolidinon) متابولیت مشتق شده از فورازولیدون است که به‌دلیل پایداری طولانی‌مدت آن در بافت، برای نظارت و تشخیص در بافت‌های خوراکی مناسب است. متابولیت AOZ به‌طور کووالانسی به پروتئین‌های سلولی در داخل بدن متصل می‌شود و در شرایط اسیدی خفیف از بافت آزاد می‌شود (۹). تشخیص بقایای فورازولیدون در مواد غذایی با روش‌های مختلفی از جمله انواع مختلف کروماتوگرافی مانند HPLC-UV، LC-MS و LC-MS/MS انجام می‌شود (۱۰). با این‌حال، این روش‌ها بسیار پرهزینه هستند. در تلاش برای ارائه یک روش غربالگری کم‌هزینه، قابل حمل و با توان بالا که قادر به تعیین متابولیت‌های نیتروفوران‌ها باشد، ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) به یک گزینه مطلوب تبدیل شده است. ELISA بر اساس رقابت آنالیت یا نمونه با یک جزء نشاندار آنزیمی (ردیاب) برای محل اتصال یک آنتی‌بادی در چاهک‌های صفحه میکروتیتر عمل می‌کند. این روش به‌صورت حساس و اختصاصی، اغلب بدون مراحل پاکسازی پیچیده امکان تشخیص کمی و کیفی متابولیت‌های نیتروفوران را می‌دهد (۱۱).

با وجود ممنوعیت استفاده از نیتروفوران‌ها در بسیاری از کشورها به‌دلیل خطرات بهداشتی ناشی از باقی‌مانده‌های آنها، این آنتی‌بیوتیک‌ها همچنان به‌طور غیر مجاز در برخی صنایع پرورش طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌عنوان مثال، در مطالعه کوتچاتانگ و همکاران (۲۰۱۹) مشخص شد که ۱۱/۱ درصد از مزارع پرورش مرغ در یائونده، کامرون، از نیتروفوران‌ها به‌عنوان بخشی از روش‌های درمانی خود استفاده می‌کنند (۱۲). همچنین، در مطالعه ویدیاسوتی (۲۰۱۲) نشان داده شد که ۱۴/۲۸ درصد از نمونه‌های گوشت جوجه‌های گوشتی به متابولیت‌های نیتروفوران‌ها آلوده بوده‌اند (۱۳). در ایران نیز، با وجود دستورالعمل‌های سازمان دامپزشکی مبنی بر ممنوعیت استفاده از فورازولیدون، شواهد موجود نشان می‌دهد که این آنتی‌بیوتیک همچنان به‌طور غیرمجاز در صنعت پرورش طیور کشور استفاده می‌شود. به‌ویژه، تحقیقات انجام شده توسط امیری، علوی و فضل آرا وجود استفاده غیر قانونی از فورازولیدون را در صنعت پرورش طیور ایران تأیید کرده‌اند (۱۱، ۱۴، ۱۵). نتایج مطالعه کوپر و کندی نیز در نمونه‌های گوشت خوک به‌منظور بررسی پایداری متابولیت‌های نیتروفوران نشان داد که متابولیت‌های مهمی نظیر ۳- آمینو-۲- اکسازولیدینون (AOZ)پس از اعمال فرآیندهای پخت‌وپز و همچنین در طول نگهداری طولانی‌مدت، به‌طور قابل توجهی همچنان پایدار باقی می‌مانند (۱۶).

با توجه به اهمیت سلامت و ایمنی تخم‌مرغ‌ها به‌عنوان یکی از مواد غذایی پرمصرف و همچنین خطرات بالقوه ناشی از وجود فورازولیدون، به تحقیق و ارزیابی دقیق‌تری از وضعیت باقی‌مانده این آنتی‌بیوتیک در محصولات غذایی نیاز است. به‌دلیل این که که باقی‌مانده‌های فورازولیدون می‌توانند به عوارض جانبی جدی برای سلامت انسان منجر شوند و همچنین با توجه به پایداری متابولیت‌های نیتروفوران در فرآیندهای پخت‌وپز و نگهداری، خطر وجود باقی‌مانده‌های این آنتی‌بیوتیک در محصولات نهایی افزایش می‌یابد. علاوه بر این، شواهد نشان‌دهده استفاده غیر مجاز از فورازولیدون در صنعت پرورش طیور در ایران است و بسیاری از مصرف‌کنندگان از وجود این آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرات منفی آنها بر سلامت آگاه نیستند. این وضعیت می‌تواند به عوامل مختلفی از جمله ضعف در اجرای مقررات، عدم آگاهی درباره خطرات بالقوه این آنتی‌بیوتیک در تولید غذا، و همچنین در دسترس بودن و قیمت مناسب آن نسبت داده شود. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در تخم‌مرغ‌های جمع‌آوری شده از مراکز خرید سطح استان گیلان طراحی شده است و می‌تواند به درک بهتری از وضعیت آلودگی و تأثیرات آن بر سلامت عمومی کمک کند. یافته‌های این تحقیق می‌تواند به تدوین راهکارهای مؤثر برای کنترل و پیشگیری از استفاده غیر مجاز از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌خصوص فورازولیدون کمک نماید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: به‌منظور انجام پژوهش حاضر، از مهر ماه تا دی ۱۳۹۶، تعداد ۶۴۶ عدد تخم‌مرغ تجاری از ۳۷ برند در سه مرحله از فروشگاه‌های مختلف سطح استان گیلان به‌صورت تصادفی خریداری و سپس به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان منتقل شد. در مرحله بعد با استفاده از سمپلر از زرده تخم‌مرغ‌ها نمونه‌برداری و به میکروتیوب منتقل و در یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت نمونه‌های زرده طبق دستورالعمل کیت تشخیص باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون (AOZ) در تخم‌مرغ بر پایه سیستم الایزا RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) Art. No. R3703 محصول شرکت Biopharm کشور آلمان آماده شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها: ابتدا ۱۰ میلی‌مولار از محلول ۲- نیتروبنزالدهید در دی‌متیل سولفوکسید تهیه شد. نمونه‌ها همگن شده و سپس یک گرم از نمونه همگن شده در داخل لوله آزمایش با ۳/۹ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول یک مولار HCl و ۲۰۰ میکرولیتر

محلول ۱۰میلی‌مولار ۲- نیترو بنزالدهید (در دی‌متیل سولفوکسید) با تکان‌دادن شدید مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، و ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ مولار K2HPO4، ۰/۴ میلی‌لیتر از محلول یک مولار NaOH و ۵ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه کرده و به مدت ۳۰ ثانیه به‌شدت تکان داده شدند و در دور ۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از لایه اتیل استات (لایه بالایی) به یک ویال جدید منتقل شد و در دمای ۶۰ سانتی‌گراد تا خشک شدن تبخیرگردید. باقی‌مانده در ۱ میلی‌لیتر محلول ان- هگزان حل و با یک میلی‌لیتر بافر (PBS-Tween) مخلوط و در دور ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و در نهایت لایه زیرین به ویال جدید منتقل شد.

آزمایش الایزا: ۵۰ میکرولیتر از استانداردها و نمونه‌های آماده شده به داخل چاهک‌ها ریخته شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه، به تمام چاهک‌ها اضافه شد. در ادامه ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی به کف هر چاهک اضافه و پلیت به آرامی تکان داده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق (۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. پس از انکوباسیون، محتویات چاهک‌ها خالی و برای اطمینان از حذف کامل مایع، نگهدارنده چاهک‌ها وارونه و روی کاغذ جذب قرار داده شد، سپس به تمام چاهک‌ها ۲۵۰ میکرولیتر از بافر شستشو اضافه و این عمل دو بار دیگر تکرار گردید. بعد از شستشوی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا/ محلول رنگ‌زا به هر چاهک اضافه و با تکان‌دادن دستی صفحه به آرامی مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به هر چاهک اضافه و با تکان‌دادن دستی صفحه به آرامی مخلوط و جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه قرائت‌گر الایزا خوانده شد و اطلاعات مربوط به میزان جذب هر چاهک به تفکیک مشخص گردید. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS۲۵ ، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی (Tukey) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند.

نتایج

در میان ۶۴۶ نمونه تخم‌مرغ جمع‌آوری شده از ۳۷ برند مختلف، تعداد ۴۱۲ نمونه (با نسبت ۶۳/۸ درصد) دارای غلظت قابل تشخیص آنتی‌بیوتیک فورازولیدون بودند در حالی که ۲۳۴ (با نسبت ۳۶/۲ درصد) نمونه تخم‌مرغ دیگر فاقد باقی‌مانده فورازولیدون بودند. نتایج بررسی باقی‌مانده فورازولیدون در نمونه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. میانگین باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در کل نمونه‌ها برابر با ۱۱۹/۰۴ نانوگرم بر کیلوگرم و کمترین و بیشترین مقادیر شناسایی شده به‌ترتیب ۳۹/۰۶و ۷۴۹/۱ نانوگرم بر کیلوگرم بود. مطابق جدول ۱ بالاترین میانگین (۴۴۱/۱) مربوط به برند ۱۶ و کمترین میانگین مربوط به برندهای ۳۱ (۳/۴۶۴) و ۳۳ (۲/۲۴۴) می‌باشد. همچنین بالاترین مقدار باقیمانده فورازولیدون شناسایی شده نیز مربوط به برند ۱۶ (۷۴۹/۱ نانوگرم بر کیلوگرم) و برند ۱ (۷۴۲/۵ نانوگرم بر کیلوگرم) بود. در این مطالعه، علاوه بر تحلیل میانگین و انحراف معیار، فاصله بین چارکی برای بررسی پراکندگی غلظت فورازولیدون در میان نمونه‌های هر برند محاسبه شد. طبق جدول ۱ برند ۱۶ بالاترین میزان فاصله بین چارکی را نشان داد که نشان‌دهنده تنوع زیاد در میزان غلظت فورازولیدون میان نمونه‌های این برند بود. جهت بررسی تأثیر برندهای مختلف بر پارامتر غلظت از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. میزان p=0.00000 در این جدول بیانگر تأثیر معنی‌دار گروه‌های برند بر میزان پارامتر غلظت است (جدول ۲). به عبارت دیگر، غلظت باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدن در بین برندهای مختلف به‌طور قابل توجهی متفاوت بود و برخی از برندها مقادیر بیشتری از باقیمانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون را در مقایسه با سایر برندها نشان داده‌اند. برای بررسی دقیق‌تر تفاوت‌های غلظت فورازولیدون میان برندهای مختلف از آزمون توکی استفاده شد. طبق این آزمون برند ۱۶ به‌طور معناداری

غلظت بالاتری نسبت به اکثر برندها داشت. به‌عنوان مثال، اختلاف میانگین غلظت فورازولیدون میان برند ۱۶ و برند ۱ برابر با ۲۸۳/۲۱ و میزان p=0.00000 محاسبه شد. هنچنین میزان P در مقایسه برند ۱۶ با سایر برندها نیز کمتر از ۰/۰۵ بود که نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در میانگین غلظت فورازولیدون میان برند ۱۶ و دیگر برندها است.

جدول ۱- پایین‌ترین مقدار، بالاترین مقدار، تعداد و درصد، میانه و میانگین غلظت فورازولیدون در نمونه‌های تخم‌مرغ

نام	تعداد نمونه‌ها	تعداد و درصد نمونه‌های دارای باقی‌مانده	پایین‌ترین مقدار (نانوگرم بر کیلوگرم)	بالاترین مقدار (نانوگرم بر کیلوگرم)	میانگین	انحراف معیار	**میانه**	فاصله بین چارکی
برند ۱	۱۹	۱۷(۸۹/۵)	۰	۷۴۲/۵	۱۶۰/۹	۱۵۰/۸	۱۴۹/۹	۴/۸
برند ۲	۲۰	۱۶(۸۰)	۰	۶۰۰/۲	۱۲۴/۳	۱۲۷/۴	۱۲۲/۵	۶۸/۲۷
برند ۳	۱۹	۱۸(۹۴/۷)	۰	۳۸۸/۷	۱۸۲/۸	۹۱/۳۴	۱۹۳/۷	۶۱/۴
برند ۴	۱۸	۱۸(۱۰۰)	۴۵/۲	۲۷۳/۳	۷۷/۷۲	۵۹/۰۱	۴۶/۲۳	۴۶/۴۲
برند ۵	۲۰	۲۰(۱۰۰)	۶۱/۰۶	۲۰۳/۷	۱۳۲/۲	۳۳/۶	۱۴۳/۸	۳۴/۷
برند ۶	۱۸	۳ (۱۶/۷)	۰	۲۵۷/۲	۲۶/۷۳	۶۸/۲۳	۰	۰
برند ۷	۱۸	۱۷(۹۴/۴)	۰	۵۴۳/۸	۲۲۹/۸	۱۳۸/۵	۱۷۵/۹	۱۳۵/۲
برند ۸	۲۰	۱۶(۸۰/۰)	۰	۲۵۰/۶	۷۹/۵	۵۹/۹۶	۸۷/۳	۳۲/۲۴
برند ۹	۸	۸(۱۰۰)	۱۲۸/۹	۳۷۴/۳	۲۵۹/۴	۷۷/۵۶	۲۷۰	۱۱۰/۳
برند ۱۰	۲۰	۲۰(۱۰۰)	۶۱/۶	۲۶۳/۴	۱۴۵	۵۳/۶۹	۱۱۷/۳	۴۷/۳
برند ۱۱	۱۶	۱۶ (۱۰۰)	۵۰/۱۴	۳۶۶/۵	۱۹۱/۲	۸۷/۵۲	۱۵۰/۶	۱۳۷/۶
برند ۱۲	۱۸	۲(۱۱/۱)	۰	۱۰۵/۵	۹/۸۱۸	۲۹/۱۷	۰	۰
برند ۱۳	۲۰	۱۴(۷۰/۰)	۰	۴۶۵/۸	۲۷۷/۴	۲۱۰	۳۷۶/۹	۴۶۵/۸
برند ۱۴	۱۲	۶(۵۰/۰)	۰	۲۹۵/۲	۱۰۵/۷	۱۲۴/۸	۲۷/۹۸	۲۳۰/۵
برند ۱۵	۲۱	۱۹(۹۰/۵)	۰	۳۸۵/۵	۱۲۴/۲	۱۰۶/۲	۷۸/۸۸	۵۵/۲۲
برند ۱۶	۱۸	۱۷(۹۴/۴)	۰	۷۴۹/۱	۴۴۴/۱	۲۸۸/۲	۳۸۵/۲	۵۸۰/۲
برند ۱۷	۹	۶(۶۶/۷)	۰	۳۴۱/۷	۱۷۶/۲	۱۴۰/۱	۲۱۹/۳	۲۹۹
برند ۱۸	۲۱	۱۸(۸۵/۷)	۰	۲۰۷/۷	۹۷/۳۶	۵۱/۴۳	۱۱۷/۹	۵۱/۷
برند ۱۹	۱۶	۱۵(۹۳/۸)	۰	۳۵۱/۹	۱۹۰/۳	۸۴/۴۹	۱۷۹/۹	۱۱۲/۲
برند۲۰	۱۹	۱۶(۸۴/۲)	۰	۶۵۶/۴	۱۵۸/۲	۱۳۷/۶	۱۵۶/۹	۱۶/۳
برند ۲۱	۱۶	۹(۵۶/۳)	۰	۲۵۷/۷	۷۲/۶۹	۸۱/۵۶	۸۸/۷۸	۱۰۵/۸
برند ۲۲	۱۹	۱۲(۶۳/۲)	۰	۲۷۰/۳	۱۴۵/۵	۱۲۸/۳	۲۱۷/۹	۲۷۰/۳
برند ۲۳	۱۸	۱۵(۸۳/۳)	۰	۲۴۷/۹	۱۶۳/۳	۸۷/۱۳	۲۱۷/۹	۱۱۰/۱
برند ۲۴	۱۹	۱۳(۶۸/۴)	۰	۷۰۴/۵	۲۶۹/۴	۲۴۸/۸	۱۷۱/۱	۴۹۱/۳
برند ۲۵	۱۷	۳(۱۷/۶)	۰	۳۵۷/۳	۵۶/۱۳	۱۲۶/۳	۰	۰
برند ۲۶	۱۵	۱۰(۶۶/۷)	۰	۴۷۸/۷	۱۵۶/۹	۱۳۹/۷	۲۰۵/۹	۲۲۵/۱
برند ۲۷	۱۸	۱۱(۶۱/۱)	۰	۲۵۴/۴	۵۴/۹۸	۶۱/۹۶	۷۱/۷۲	۷۷/۷۴
برند ۲۸	۱۸	۱۴(۷۷/۸)	۰	۲۴۳/۷	۹۴/۰۲	۶۶/۴۵	۱۲۴/۹	۱۰۳
برند ۲۹	۱۱	۶(۵۴/۵)	۰	۳۲۰/۵	۸۷/۹۸	۱۰۱/۶	۱۱۱/۲	۱۵۲/۵
برند ۳۰	۲۰	۱۲(۶۰/۰)	۰	۱۰۳/۳	۵۷/۹۲	۵۰/۱۴	۸۸/۹۶	۱۰۳/۳
برند ۳۱	۲۰	۱(۵/۰)	۰	۶۹/۲۹	۳/۴۶۴	۱۵/۴۹	۰	۰
برند ۳۲	۱۹	۴(۲۱/۱)	۰	۱۹۹/۳	۲۵/۲۱	۵۹/۲۱	۰	۰
برند ۳۳	۱۹	۱(۵/۳)	۰	۴۲/۶۳	۲/۲۴۴	۹/۷۸	۰	۰
برند ۳۴	۲۰	۳(۱۵/۰)	۰	۱۱۱/۵	۱۰/۳۴	۲۷/۹۴	۰	۰
برند ۳۵	۱۷	۱۴(۸۲/۴)	۰	۱۸۳/۶	۶۸/۰۶	۵۰/۵۴	۵۸/۰۹	۲۶/۰۶
برند ۳۶	۱۴	۱(۷/۱)	۰	۸۹/۶۷	۶/۴۰۵	۲۳/۹۶	۰	۰
برند ۳۷	۱۶	۱(۶/۳)	۰	۱۷۹/۹	۱۱/۲۴	۴۴/۹۷	۰	۰

جدول ۲- آنالیز آماری تاثیر گروه‌های برند بر میزان پارامتر غلظت

پارامتر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	آزمون فیشر	P
غلظت	۳۶	۵۶۸۵۴۴۴	۱۵۷۹۲۹/۰	۱۲/۶۹۶۲	...../.
باقیمانده ها	۶۰۹	۷۵۷۵۳۹۷	۱۲۴۳۹/۱		
کل	۶۴۵	۱۳۲۶۰۸۴۰	۱۷۰۳۶۸/۱		

در جدول۲ میزان p=0.00000 در ردیف اول بیانگر تاثیر معنی‌دار گروه‌های برن بر روی میزان پارامتر غلظت بود.

بحث و نتیجه‌گیری

آنتی‌بیوتیک‌ها دستهٔ بسیار مهمی از داروها هستند، زیرا آنها یک جزء کلیدی در استراتژی مورد استفاده در کنترل عفونت‌های باکتریایی در انسان و حیوان می‌باشند. بنابراین مهم است که استفاده از آنها در غذای حیوانات با نهایت دقت انجام شود. آنتی‌بیوتیک‌ها باید در دوزهای توصیه شده و با نظارت مناسب داده شوند و پس از مصرف درمانی در تمام دام‌های کشتار شده دوره نگهداری کافی رعایت شود (۱۷). گوشت، مرغ و تخم‌مرغ از مواد غذایی مهم برای تأمین نیازهای غذایی جمعیت انسان در حال رشد هستند. استفاده کنترل نشده و نامحدود از آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است منجر به تجمع باقی‌مانده‌های نامطلوب در بافت‌های حیوانی و محصولات آنها شود (۳).

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده استفاده وسیع از فورازولیدون در صنعت پرورش طیور در ایران است. در این مطالعه درصد تخم‌مرغ‌های آلوده به آنتی‌بیوتیک فورازولیدون ۶۳/۸ درصد بود و در تمام برندها، باقیمانده فورازولیدون با غلظت‌های متفاوت شناسایی شد. طبق نتایج این مطالعه در بیست و هشت برند تعداد تخم‌مرغ‌های آلوده بیش از پنجاه درصد و در ده برند بیش از نود درصد نمونه‌ها به فورازولیدون آلوده بودند. همچنین طبق نتایج، باقیمانده فورازولیدون در تمام تخم‌مرغ‌ها در پنج برند مشاهده شده است. با توجه به ممنوعیت نیتروفوران‌ها برای حیوانات خوراکی در ایران، تمامی تخم‌مرغ‌های مثبت در این مطالعه (۶۳/۸ درصد) می‌تواند غیر قابل قبول باشد. این میزان آلودگی نه‌تنها سلامت مصرف‌کنندگان را تهدید می‌کند، بلکه می‌تواند به کاهش اعتماد عمومی به محصولات طیوری منجر شود. علاوه بر این، عدم رعایت استانداردهای ایمنی غذایی ممکن است به بروز مشکلات بهداشتی و افزایش هزینه‌های درمانی در آینده منجر گردد. در این مطالعه طبق نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌داری در غلظت باقی‌مانده‌های فورازولیدون در برندهای مختلف مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده این است که اختلاف غلظت باقی‌مانده فورازولیدون در برندهای مختلف تصادفی نیست و شیوه‌های مختلف تولید و عواملی مانند دوز، زمان و مدت زمان تجویز آنتی‌بیوتیک و همچنین اقدامات کنترل کیفیت به‌کار گرفته شده توسط هر برند نقش مهمی در میزان آلودگی تخم‌مرغ به آنتی‌بیوتیک ایفا می‌کنند.

استفاده از تکنیک‌های مختلف آزمایشگاهی، مانند HPLC و ELISA، می‌تواند منجر به تفاوت‌های معناداری در شناسایی و اندازه‌گیری باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیک‌ها شود، زیرا هر یک از این روش‌ها ویژگی‌ها و حساسیت‌های خاص خود را دارند. در حالی که HPLC با دقت بالا و توانایی شناسایی ترکیبات پیچیده در سطوح کم معروف است، ELISA به خاطر سادگی و سرعت در پردازش نمونه‌ها و قابلیت شناسایی خاص ترکیبات مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین، انتخاب مناسب‌ترین روش بستگی به نوع ماده مورد آزمایش، نیاز به دقت و سرعت در نتایج و هزینه‌های مرتبط با هر تکنیک دارد. با بررسی نتایج پژوهش‌های داخل و خارج از ایران، می‌توان الگوهای مشخصی را در استفاده از فورازولیدون شناسایی نمود که درک بهتری از وضعیت کنونی و چالش‌های پیش رو را فراهم می‌آورد. این بینش می‌تواند به سیاست‌گذاران کمک کند تا تصمیمات بهتری در راستای کنترل این آلودگی اتخاذ نمایند. در تحقیقی که توسط امیری و همکاران (۲۰۱۴) در ایران به‌منظور بررسی متابولیت فورازولیدون (AOZ) در تخم‌مرغ به روش الایزا انجام شد، درصد تخم‌مرغ‌های آلوده در تخم‌مرغ‌های مارک‌دار ۷۱ و در تخم‌مرغ‌های بدون مارک ۶۲ درصد گزارش شد و میانگین غلظت AOZ در نمونه‌های مارک، بدون مارک و در کل نمونه‌ها به‌ترتیب ۲۵۲/۹، ۲۸۳/۷ و ۲۶۸/۲۵ نانوگرم در کیلوگرم گزارش شد که که بالاتر از سطح به‌دست‌آمده در مطالعه ما است (۱۱). در تحقیقی مشابه توسط فضل آرا و همکاران در سال ۲۰۱۴ در اهواز، باقیمانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در جوجه‌های گوشتی به روش HPLC در کشتارگاهی در اهواز بررسی شد. میانگین مقدار فورازولیدون در مخلوط عضلات سینه و

ران ۱/۳۷ ± ۲۸/۱۵ میکروگرم در هر کیلوگرم تعیین گردید که ۳۹ درصد از نمونه‌ها از نظر وجود داروی فورازولیدون مثبت بودند، میانگین غلظت به‌دست‌آمده در این مطالعه بیشتر از مقدار مطالعه حاضر است اما درصد نمونه‌های آلوده پایین‌تر از مطالعه حاضر می‌باشد، با وجود پایین‌تر بودن درصد نمونه‌های آلوده، این مطالعه نیز تأییدکننده استفاده غیر مجاز از آنتی‌بیوتیک فورازولیدون می‌باشد (۱۵). علوی و همکاران در سال ۲۰۰۰ میزان فورازولیدون و فورالتادون را در تخم‌مرغ و بافت‌های طیور به روش HPLC اندازه‌گیری نمودند که حداقل غلظت شناسایی شده برای فورازولیدون یک نانوگرم در هر گرم بود که پایین‌تر از حداقل غلظت شناسایی شده در این مطالعه می‌باشد (۱۴). در حالی که نتایج مطالعات انجام شده در ایران نشان‌دهنده استفاده غیر مجاز از آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفوران در دامپزشکی است، تحقیقات انجام‌شده در کشورهای دیگر، حاکی از موفقیت در کاهش یا حذف این آنتی‌بیوتیک‌ها از مواد غذایی با منشاء حیوانی است. در مطالعه رادوونیکوویچ و همکاران (۲۰۱۳) طی تجزیه و تحلیل نمونه‌های تخم‌مرغ (n = ۵۲) با استفاده از UHPLC-MS/MS برای متابولیت‌های AOZ، AMOZ، AHD و SEM، هیچ‌یک از متابولیت‌ها در نمونه‌ها شناسایی نشد (۱۸). بوک و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از روش LC-MS/MS مطالعه‌ای در مورد باقیمانده‌های فورازولیدون در تخم‌مرغ‌های مصرف‌شده در برلین انجام دادند. میانگین باقیمانده متابولیت AOZ ۳۰ نانوگرم بر کیلوگرم (ppt) بود که پایین‌تر از میانگین غلظت فورازولیدون در مطالعه حاضر می‌باشد (۱۹). تیواری و همکاران در سال ۲۰۰۸ مقدار باقیمانده فورازولیدون در مرغ گوشتی را به‌وسیله آزمون میکروبی بررسی کرده و مقدار آن را در کلیه، کبد و سرم به‌ترتیب ۲۷۰ و ۱۶۰ نانوگرم در هر گرم و ۸۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۰). در مطالعه یبار و همکاران (۲۰۱۲) بر روی نمونه‌های جگر مرغ (۹۰ نمونه) جمع‌آوری‌شده از سوپرمارکت و فروشگاه‌های خرده‌فروشی محلی در ترکیه به‌منظور بررسی متابولیت AOZ با استفاده از یک کیت تجاری الایزا، تعداد نمونه‌های آلوده ۱۱ نمونه (۱۲ درصد) با غلظت میان ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش داده شد (۲۱). عوامل متعددی ممکن است تفاوت مشاهده شده میان نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه را توضیح دهند، از جمله این عوامل می‌توان به شرایط آب و هوایی و جغرافیایی مناطق مختلف، عدم رعایت مدت زمان انتظار، فصول مختلف جمع‌آوری نمونه‌ها، روش‌های متفاوت در تجویز دارو، روش نمونه‌گیری، نحوه آماده‌سازی نمونه‌ها و روش‌های متفاوت در شناسایی دارو باشد. علاوه بر این، شیوع بالای مقدار باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در این مطالعه ممکن است ناشی از عدم وجود نظارت مؤثر بر کنترل مصرف این دارو در صنعت پرورش طیور در ایران، فراوانی و دسترسی آسان و بدون نیاز به نسخه برای این دارو باشد. عدم آلودگی یا پایین‌تر بودن تعداد نمونه‌های آلوده در تحقیقات خارج از ایران می‌تواند نشان‌دهنده قوانین سختگیرانه و نظارت مؤثر بر عدم مصرف آنتی‌بیوتیک فورازولیدون در صنعت پرورش طیور در این کشورها باشد. در کشورهای عضو اتحادیه اروپا، کنترل باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی با منشأ حیوانی به‌وسیله قوانین و مقررات دقیق سازمان دارویی اروپا (EMA) انجام می‌شود. این سازمان آنتی‌بیوتیک‌ها را به چهار دسته A، B، C و D تقسیم‌بندی می‌کند که دسته A شامل آنتی‌بیوتیک‌هایی است که برای استفاده در حیوانات تولیدکننده مواد غذایی ممنوع هستند. همچنین، تجویز مواد ضد میکروبی تنها در موارد ضروری و بر اساس آزمایش حساسیت مجاز است و استفاده از این داروها برای افزایش رشد یا تولید ممنوع می‌باشد. پروژه نظارت بر فروش و مصرف آنتی‌بیوتیک‌های دامپزشکی (ESVAC) نیز به شناسایی خطرات مرتبط با مقاومت آنتی‌میکروبی کمک می‌کند (۲۲). این رویکردها می‌توانند به‌عنوان مرجع و الگویی برای بهبود مدیریت آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران مورد توجه قرار گیرند. همچنین برقراری یک سیستم نظارتی مؤثر و

آموزش به دامپروران درباره خطرات مصرف غیر مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها و روش‌های جایگزین، نظارت دقیق‌تر بر تولید و توزیع آنتی‌بیوتیک‌ها، اجرای دوره‌های آموزشی برای دامپزشکان و رعایت زمان انتظار قبل از جمع‌آوری محصولات دامی، توسعه سیستم‌های ردیابی مصرف داروها، و اعمال جریمه‌های سنگین برای متخلفان می‌تواند به کاهش آلودگی کمک کند.

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده وجود متابولیت آنتی‌بیوتیک فورازولیدون (AOZ) در تخم‌مرغ‌های برند جمع‌آوری‌شده از سوپرمارکت‌های سطح استان گیلان و در نتیجه استفاده غیر مجاز از این آنتی‌بیوتیک در مزارع پرورش طیور در ایران می‌باشد. با توجه به عوارض جانبی سمی، جهش‌زایی یا سرطان‌زایی این آنتی‌بیوتیک بر سلامت انسان، نظارت کارآمد و منظم بر صنعت پرورش طیور به‌منظور جلوگیری از استفاده از آنتی‌بیوتیک فورازولیدون و سایر آنتی‌بیوتیک‌های ممنوع در پرورش طیور و انجام مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

این اثر، بخشی از پایان‌نامه دکتری نویسنده است. نویسندگان از کلیه کارکنان گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان تشکر می‌کنند.

References

1- Lawal JR, Jajere SM, Geidam YA, Bello AM, Wakil Y, Mustapha M. Antibiotic residues in edible poultry tissues and products in Nigeria: A potential public health hazard. *J Anim Vet Adv*. 2015; 7(3): 55-61.

2- Mund MD, Khan UH, Tahir U, Mustafa BE, Fayyaz A. Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *Int J Food Prop*. 2017; 20(7): 1433-1446.

3- Islam A, Saifuddin A, Al Faruq A, Islam S, Shano S, Alam M, *et al.* Antimicrobial residues in tissues and eggs of laying hens at Chittagong, Bangladesh. *Int J One Health*. 2016; 2(2): 75-80.

4- Rana A, Rana AYKM, Prince MMB, Chakma D, Islam H, Nabi M, Saifullah A. Validation of a commercial ELISA kit for screening 3-amino-2-oxazolidinone, a furazolidone antibiotic residue in shrimp. *Annu Res Rev Biol*. 2020; 34(2): 1-10.

5- Nehru R, Chen CW, Dong CD. Recent advances in electrochemical detection of furazolidone: *A review. Microchem J*. 2024; 109901.

6- Vass MK. Hruska M. Franek, Nitrofuran antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. *Vet Med*. 2008; 53(9): 469.

7- Zhou Q, Gao Y, Tang M, Zhang J, Zhang X, Gu R, *et al.* Progress on determination methods of nitrofuran metabolites in foods. *J Food Saf Qual*. 2016; 7(8): 3285-3290.

8- Zhang Z, Wu Y, Li X, Wang Y, Li H, Fu Q, *et al.* Multi-class method for the determination of nitroimidazoles, nitrofurans, and chloramphenicol in chicken muscle and egg by dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 2017; 217: 182-190.

9- Franek M, Diblikova I, Vass M, Kotkova L, Stastny K, Frgalova K, *et al.* Validation of a monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of the furazolidone metabolite (AOZ) in eggs using various sample preparation. *Vet Med (Praha)*. 2006; 51(5): 248.

10- Li J, JX, Liu JP. Wang. Multidetermination of four nitrofurans in animal feeds by a sensitive and simple enzyme-linked immunosorbent assay. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(6): 2181-2185.

11- Amiri HM, Tavakoli H, Hashemi G, Mousavi T, Rostami H, Fesharaki MG, *et al.* The occurrence of residues of furazolidone metabolite, 3-Amino-2-Oxazolidone, in eggs distributed in Mazandaran province, Iran. *Scimetr*. 2014; 2(4). [In Persian]

12- Keutchatang FDPT, Kamgain ADT, Isabelle S, Nama GM, Kansci G. Practices of Usage of Antibiotics in Chicken Farming and Impact of Some of their Residues in Products Consumed in Yaoundé, Cameroon. Adv Nutr Food Sci. 2019;4(3):1-7. doi: 10.33140/ANFS.

13- Widiastuti R. Detection of nitrofurans residue in broiler chicken meat analysed by HPLC. *J Ilmu Ternak dan Vet*. 2012; 17(4): 284-289.

14- Alawi M. Analysis of furazolidone and furaltadone in chicken tissues and eggs using a modified HPLC/ELCD method. Fresenius Environ. *Bull*. 2000; 9(7/8): 508-514.

15- Fazlara A, Mayahi M, Najafzadeh Varzi H, Gudarznia F, Mohammadyari S. Determination the Amount of Illegal Furazolidone Residues in Broilers in Ahvaz Abattoir by HPLC Method. *Armaghane Danesh*. 2014; 19(3): 252-264. [In Persian]

16- Cooper KM, Kennedy DG. Stability studies of the metabolites of nitrofuran antibiotics during storage and cooking. *Food Addit Contam*. 2007; 24(9): 935-42.

17- Ngangom BL, S.S.A. Tamunjoh, F.F. Boyom. Antibiotic residues in food animals: Public health concern. Acta Ecol. *Sin*. 2019; 39(5): 411-415.

18- Radovnikovic A, Conroy ER, Gibney M, O'Mahony J, Danaher M. Residue analyses and exposure assessment of the Irish population to nitrofuran metabolites from different food commodities in 2009–2010. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2013; 30(11): 1858-1869.

19- Bock C, Stachel C, Gowik P. Validation of a confirmatory method for the determination of residues of four nitrofurans in egg by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with the software InterVal. *Anal Chim Acta*. 2007; 586(1-2): 348-358.

20- Tiwari H, Tiwari JG. Studies on the residues of terramycin and furazolidone in broiler meat-A public health concern. *Indian J Public Health*. 2008; 52(1): 33.

21- Yibar A, Cetinkaya F, Soyutemiz G. Nitrofuran metabolite 3-amino-2-oxazolidinone residues in chicken liver: A screening study. *Asian J Anim Vet Adv*. 2012; 7: 346-350.

22- Schmerold I, van Geijlswijk I, Gehring R. European regulations on the use of antibiotics in veterinary medicine. *Eur J Pharm Sci*. 2023; 189: 106473.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 46-55

Assessing Furazolidone Antibiotic Residue in commercial eggs by ELISA method

Hadiseh Sanakhan Rezaiyeh[1], Leila Modiri[1*], Arash Chaichi Nosrati[1]

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

Receive: August 21, 2024; Revise: November 5, 2024; Accept: November 5, 2024

10.22034/nfvm.2024.474638.1252

Summary

Furazolidone is an antibiotic from the nitrofuran family that has antimicrobial properties against gram-positive and gram-negative bacteria and is commonly used to treat bacterial infections such as enteritis and gastroenteritis. Additionally, this drug is used as a feed additive and growth promoter in the poultry industry. However, due to its toxic side effects and the risk of antibiotic resistance, the use of nitrofurans in poultry farming is prohibited in Iran. Therefore, this study investigates the residual metabolite of furazolidone (AOZ) in branded eggs purchased in Gilan province. In the present study, 646 branded eggs were randomly purchased and collected in three stages from different stores in Gilan province. Samples were tested utilizing RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) Art. No. R3703 kit to examine the antibiotic furazolidone (AOZ) metabolite. The results were analyzed using SPSS software and one-way analysis of variance (ANOVA). Among the 646 egg samples collected, 412 samples (63.8%) were infected with furazolidone antibiotic. The mean concentration of furazolidone antibiotic residue was 119.04 ng/kg, and the lowest and highest values detected were 39.06 ng/kg and 749.1 ng/kg, respectively. The results indicate the presence of furazolidone antibiotic residues in egg samples. Therefore, it seems necessary to monitor the poultry breeding industry regularly due to the dangers of antibiotic residues in eggs and the prohibition of applying furazolidone.

Keywords: *Antibiotic residue, furazolidone, AOZ, ELISA, egg*