المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٦، عدد إضافي ٢، ٢٠١٢ (١٦٥-١٦٨)
وقائع المؤتمر العلمي السادس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

استخدام تقنية الاليزا للكشف عن بقايا ستربتومايسين في الحليب

عمر احمد عبدالله

فرع الصحة العامة البيطرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

شملت هذه الدراسة فحص ٤٥ عينة من الحليب توزعت مابين ١٥عينة حليب مجفف مستورد، ١٠ عينات حليب سائل مستورد، ١٠ عينات حليب بقر محلي، ١٠ عينات حليب ضأن محلي والتي جمعت للفترة بين ايلول ٢٠١٠ ولغاية نيسان ٢٠١١ من مختلف أسواق مدينة الموصل (العراق)، للكشف عن مستوى بقايا (ثمالة) ستربتومايسين باستخدام تقنية الادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (الاليزا). أظهرت نتائج البحث أن نسبة العينات الموجبة لبقايا ستربتومايسين في الحليب بلغت ٥٣,٣% توزعت النسب كالأتي ١٥,٦% في حليب الضأن المحلي، ١٣,٣% في حليب البقر المحلي، ١١,١% في حليب السائل المستورد و١٣,٣% في حليب المجفف المستورد وبمعدلات ٢٢,٨، ٢٠,١، ١٢,٦، ١٩,٩ مايكروغرام /كغم حليب، على التوالي. من هذه النتائج يتضح أن جميع عينات الحليب يقع تركيزها ضمن الحدود المسموح بها عالميا وإنها صالحة للاستهلاك البشري.

Use of ELISA technique for detection of streptomycin residues in milk

O.A. Abdullah

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

This study involved examination of 45 milk samples were distributed as: 15 imported milk powder, 10 imported liquid milk, 10 local cow's milk, 10 local sheep's milk. These samples were collected from September 2010 to April 2011 at different markets in Mosul city (Iraq) in order to detect level of streptomycin residue using Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) technique. The results showed that the percentage of positive samples of streptomycin residue in milk was 53.3%, and as follow 15.6% in the local sheep's milk samples, 13.3% in the local cow's milk samples, 11.1% in the imported liquid milk samples and 13.3% in the imported milk powder samples with mean value of 22.8, 20.1, 12.6 and 19.9 µg/kg milk, respectively. From these results, it is clear that all samples of milk had residual streptomycin level within the permissible limits and it is regarded as safe for human consumption.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

يعد الحليب من أكثر الأغذية استهلاكا" على النطاق العالمي، ذلك لأهميته في نمو الانسان و لاحتوائه على العناصر الغذائية المتنوعة، كالأحماض الدهنية و البروتين و والكالسيوم. وبسبب مكانته الهامة بين المنتجات الغذائية حيوانية المنشأ، لابد من الاعتناء بالحيوانات المنتجة للحليب من أجل الحصول على منتجات صحية صالحة للاستهلاك البشري (١). يرتبط إنتاج الأطعمة ذات الأصل الحيواني باستخدام بعض المواد الكيميائية بهدف حماية المنتج النهائي أو زيادته مثال على ذلك الأدوية والمبيدات والإضافات العلفية لزيادة إنتاج اللحوم والحليب والبيض إذ يعد وجود آثار مثل هذه المواد في الأطعمة ذات تأثير سلبي على صحة الإنسان ويطلق عليها اسم المتبقيات (الثمالات) (٢). أن ظهور المشاكل الصحية عند مختلف أنواع الحيوانات استدعى استخدام المضادات الحيوية إمّا كأسلوب وقائي أو علاجي للأمراض التي تصيب الحيوانات (٣). كما تعد المضادات الحيوية ومن ضمنها الامينوكلوكوساید شائعة الاستعمال في مجال الطب البيطري لتأثيراتها العلاجية ضد الأمراض وخاصة الالتهابات البكتيرية التي تسببها عصيات هوائية سالبة لصبغة كرام وبعض الجراثيم الموجبة لصبغة كرام،

ومن أهم أنواع الامينوكلوكوساید هي ستريبتومايسن streptomycin والداي هايدروستربتومايسين dihydrostreptomycin حيث توجد صلة وثيقة بينهما في التركيب علاوة على ذلك تأثيراتهما المتشابهة ضد البكتريا بالإضافة إلى أن بكتريا Streptomyces griseus تنتج هذين النوعين من الامينوكلوكوساید (٤). يشيع استعمال ستربتومايسن لمعالجة الأمراض الجرثومية في الماشية والأغنام والدواجن عن طريق الحقن أو ماء الشرب فضلا عن استعماله عن طريق الحقن داخل الضرع (Intramammary) ممزوجا بـ بنزايل بنسلين Benzyl penicillin. كما تحدث بقايا ستربتومايسين في الأغذية ذات الأصل الحيواني نتيجة لعدم الاهتمام بفترات سحبه قبل الذبح أو الاستعمال الخاطئ والعشوائي وغير المنتظم لهذا الدواء أو إعطائه بجرع عالية (٢). إن التعرض المستمر لتراكيز مختلفة حتى وان كانت منخفضة من ستربتومايسين قد تسبب تأثيرات سلبية من ناحية تشكيل عترات جرثومية جديدة مقاومة له بالإضافة إلى اضطرابات في عمل النبت المعوي (٥). وقد وجد أن الحقن الوريدي والعضلي للستربتوممايسين يبقي القليل من ثمالته في الحليب بعد فترة سحبه بينما كانت ثمالته عالية في الحليب عند حقنه داخل الرحم أو الضرع (Intramammary) (٦،٧). إن مرور المضادات الحيوية إلى الحليب في الحيوانات المعالجة تسبب مشاكل رئيسية لنوعية الحليب الخام لأنه يثبط عمل البادئ في تخمر وتصنيع منتجات الألبان (٨، ٩). حددت المفوضية الأوربية (Commission European) الحد الأعلى المسموح به لثمالة ستربتومايسين (Maximum Residue Limits (MRLs)) للمنتجات الحيوانية بـ ٢٠٠ مايكروغرام /كغم حليب و ٥٠٠ مايكروغرام / كغم لحم (١٠). عادة يتم إجراء الكشف عن ثمالات المضادات الحيوية عادة بالطرق المايكروبايولوجية (١١) ولكن هذه الطريقة غالبا ما تفتقر إلى الدقة والحساسية المطلوبة لذلك تم استخدام طرق مناعية والتي عادة ما تكون أكثر حساسية وأعلى دقة وخير مثال على ذلك تقنية الاليزا (١٢) فضلا عن استخدام الطرق الكيميائية التحليلية كما في High Performance Liquid Chromatography LC /Liquid Chromatography HPLC للكشف عن بقايا ستربتومايسين (١٣). من اجل ضمان سلامة الأغذية ذات الأصل الحيواني وحماية صحة الإنسان وندرة البحوث في العراق ضمن هذا المجال هدفت الدراسة الى البحث عن بقايا ستربتومايسين في أنواع مختلفة من الحليب.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت ٤٥ عينة من الحليب ١٠ عينات حليب بقر محلي و١٠ عينات حليب ضأن محلي و ١٠ عينات حليب مجفف مستورد و ١٥ عينة حليب سائل مستورد) عشوائيا من مختلف أسواق مدينة الموصل للفترة ما بين أيلول ٢٠١٠ ولغاية نيسان ٢٠١١، حفظت عينات حليب البقر والضأن بعلب بلاستيكية سعة ٥٠٠ مل وبدرجة حرارة -١٨°م لحين إجراء الفحص عليها في المختبر المركزي للبحوث، كلية الطب البيطري /جامعة الموصل.

تحضير عينات الحليب

تم تحضير محلول تخفيف العينات (PBS-Tween-buffer) اعتمادا على تعليمات الشركة المجهزة لعدة الاليزا حيث تم وضع (٠,٥٥ غم فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين +٢,٨٥ غم فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين + ٩ غم ملح نقي + ٠,١ % Tween 20) في دورق زجاجي وأكمل الحجم إلى ١ لتر. اخذ ١٠ غم من الحليب المجفف وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل، بعد ذلك اخذ ٥٠ مل من كل عينة من عينات الحليب التي تم جمعها ووضعت بجهاز الطرد المركزي على سرعة ٤٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ١٠ دقائق لإزالة طبقة الدهن العليا ثم اخذ ٥٠ مايكروليتر من كل عينة وأضيف إليها ٩٥٠ مايكروليتر من محلول (PBS – Tween- buffer) (١+١٩) بعد ذلك أصبحت جميع العينات جاهزة لإجراء الاختبار.

تقدير ثمالات الستربتومايسين باستخدام الاليزا

استخدم في تقدير بقايا ستربتومايسين في الحليب عدة الاليزا المجهزة من قبل شركة R- biopharm الالمانية. وضعت عدة الاليزا والعينات بدرجة حرارة الغرفة ٢٥°م بعدها تم تحديد ٦ حفر على طبق الاليزا للمحاليل القياسية حيث أضيف لكل حفرة ٥٠ مايكروليتر وأضيف ٥٠ مايكروليتر من كل عينة إلى الحفر المتبقية بعد ذلك تم إضافة كل من الأجسام المضادة (Antibodies) والمقترن (Conjugate) بمقدار ٥٠ مايكروليتر لكل الحفر وتم التحريك الطبق بلطف يدويا وحضن لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة ٢٥°م. تم سكب جميع محتويات الطبق وأضيف ٢٥٠ مايكروليتر من محلول الغسل إلى الحفر كافة بعدها سكب محتوى الطبق ونشف بمناديل نظيفة، كررت العملية مرتين. أضيف ١٠٠ مايكروليتر من كاشف اللون (Chromogen) للحفر جميعا ورجت محتويات الطبق بلطف وحضنت لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في الظلام، وأخيرا أضيف ١٠٠ مايكروليتر من محلول موقف التفاعل (Stop solution) للحفر جميعا بعد ذلك تمت قراءة الطبق باستخدام القارئ ELISA Reader وبطول موجي ٤٥٠ نانوميتر.

حساب النتيجة

باستخدام برنامج خاص مجهز من قبل الشركة المصنعة RIDA SOFT WIN والمصمم لمعالجة النتائج والحصول على التراكيز بعد ذلك تم ضرب التراكيز بعامل التخفيف ٢٠ للحصول على النتائج النهائية.

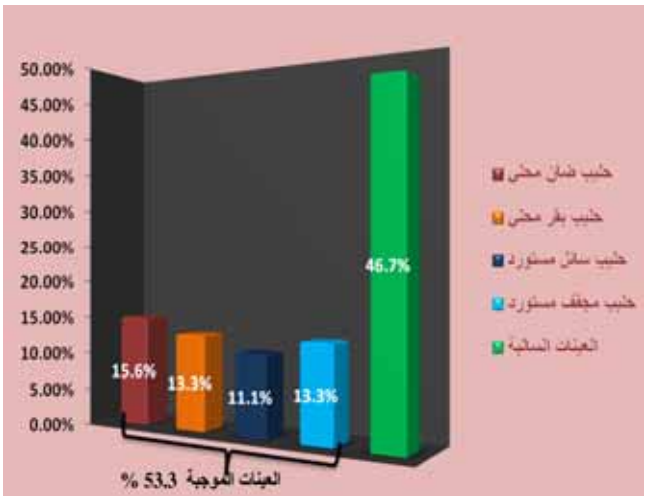
النتائج

أتضح من نتائج فحص عينات الحليب أن هناك ٢٤ عينة موجبة في محتواها على بقايا ستربتومايسين (٦ عينات حليب مجفف مستورد، ٥ عينات حليب سائل مستورد، ٦ عينات حليب بقر محلي، ٧ عينات حليب ضان محلي) وبمدى تراوح مابين ١٨-٢٤,٣ و ١٠,٢-١٧,٨ و ١٩,١-٢١,٨ و ١٧,٧-٢٨,١ مايكروغرام/كغم حليب على التوالي وبمعدل ١٩,٩±٠,٧ و ١٢,٦±١,٤ و ٢٠,١±٠,٤ و ٢٢,٨±١,٤ مايكروغرام /كغم حليب على التوالي كما هو موضح في الجدول (١).

الجدول (١) مدى ومعدل تركيز بقايا ستربتومايسين في عينات الحليب.

العينات	العينات المفحوصة	العينات الموجبة لبقايا ستربتومايسين	المدى مايكروغرام /كغم	المعدل ± الخطأ القياسي
حليب مجفف مستورد	١٥	٦	١٨ - ٢٤,٣	١٩,٩ ± ٠,٧
حليب سائل مستورد	١٠	٥	١٠,٢ - ١٧,٨	١٢,٦ ± ١,٤
حليب بقر محلي	١٠	٦	١٩,١ - ٢١,٨	٢٠,١ ± ٠,٤
حليب ضان محلي	١٠	٧	١٧,٧ - ٢٨,١	٢٢,٨ ± ١,٤
المجموع الكلي	٤٥	٢٤	١٠,٢ - ٢٨,١	١٩,١ ± ٠,٩

أما في ما يخص المعدل الكلي لتركيز بقايا ستربتومايسين لعينات أنواع الحليب فقد بلغ ١٩,١±٠,٩مايكروغرام /كغم حليب وبمدى تراوح مابين ١٠,٢ - ٢٨,١ مايكروغرام /كغم حليب. أما نسب تلوث أنواع الحليب ببقايا ستربتومايسين فكانت نسبة تلوث حليب الضان المحلي ١٥,٦%، نسبة تلوث حليب البقر المحلي ١٣,٣%، نسبة تلوث الحليب السائل المستورد ١١,١% ونسبة تلوث الحليب المجفف المستورد ١٣,٣% من مجموع العينات الكلية ومجموع نسب عينات الحليب الكلية الموجبة لبقايا ستربتومايسين فقد بلغت ٥٣,٣% يقابلها ٤٦,٧% لنسب عينات الحليب السالبة وكما موضح في الشكل (١).



الشكل (١) نسبة تلوث عينات الحليب ببقايا ستربتومايسين.

المناقشة

إن الحليب من أهم الأغذية المعدة للاستهلاك البشري ويعد الحفاظ على شروط إنتاجه وتصنيعه وتسويقه ضرورة من ضروريات سياسة البلد الغذائية إذ يتلوث الحليب بعدة ملوثات من أهمها بقايا المضادات الحيوية نتيجة لعلاج الحيوانات المريضة بهذه الأدوية حيث تطرح هذه المضادات الحيوية مع الحليب (١٤). أو عن طريق إضافة المضادات الحيوية مباشرة إلى الحليب الخام لحمايته من التلف لفترات أطول (١٥). من اجل سلامة وحماية المستهلك زادت الاهتمامات في السنوات الأخيرة ببقايا المضادات الحيوية في منتجات الحليب لما تشكله من مضار على صحة الإنسان، إذ أن درجة حرارة الغليان لا تؤثر في المضاد الحيوي ستربتومايسين وهذا ما يزيد من مشكلة التلوث (١٦). لذلك كان الهدف من هذه الدراسة الكشف عن المستويات المتبقية من ستربتومايسين في الحليب لمدينة الموصل باستخدام. كشفت نتائج البحث أن اكثر من ٥٠% من عينات أنواع الحليب المختلفة كانت موجبة لبقايا المضاد الحيوي ستربتومايسين وبتراكيز مختلفة إلا أن جميعها كانت ضمن الحدود المسموح بها عالميا (٢٠٠ مايكروغرام /كغم حليب) (١٧). شكلت أعلى نسبة تواجد بقايا ستربتومايسين في حليب الضأن المحلي وهذا قد يدل على كثرة الأمراض المتوطنة في المحافظة والحاجة لعلاجها أو إلى تدني مستوى الثقافة الصحية عند المربين من ناحية عدم استبعاد حليب الحيوانات المعالجة في الفترة التي يكون فيها تركيز المضاد الحيوي ضارا بالصحة أو الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية. وهذا يعني وجود تأثيرات سلبية لهذه المتبقيات على صحة الإنسان فقد أشار (١٨) إلى أن التعرض المستمر ولفترات طويلة لثمالات الأدوية تؤدي إلى الحساسية نتيجة لتثبيط الجهاز المناعي بهذه المضادات الحيوية ونشوء عترات من الجراثيم مقاومة لبعض المضادات الحيوية وأثارها الضارة على الكبد.

جاءت النتائج مقاربة لنتائج الباحث (١٩) بأن حوالي ٦٩,٣ % من عينات الحليب في اليونان كانت ملوثة ببقايا ستربتومايسين بينما أشار الباحث (٢٠) أن ٨٠,٩ % من عينات الحليب في تركيا كانت ملوثة ببقايا ستربتومايسين وكانت هذه أعلى من نتائج دراستنا.أما نسبة تلوث الحليب ببقايا ستربتومايسين في رومانيا فقد بلغت ١٥,١% (٢١) وفي كرواتيا فكان معدل التلوث ببقايا ستربتومايسين ٧,٦٧ مايكروغرام /كغم حليب وهي اقل من معدل التلوث في دراستنا (٢٢). مما تقدم فمن الضروري تطبيق الإدارة الصحية في تربية ماشية الحليب من حيث النظافة العامة والوقاية من الأمراض وخاصة التهاب الضرع الذي يعد السبب الرئيس لتلوث الحليب ببقايا المضادات الحيوية فضلا عن إعداد برامج تثقيفية حول مخاطر استهلاك الحليب الملوث ببقايا المضادات الحيوية والتأكيد على ضرورة تطبيق اختبارات الكشف عن بقايا المضادات الحيوية ومن ضمنها ستربتومايسين في الحليب والمنتجات الغذائية المستوردة قبل دخولها العراق والتأكد من خلو هذه المنتجات الحيوانية من هذه بقايا المضادات الحيوية والسماح بعد ذلك بدخولها من المنافذ الحدودية للعراق، كما ويجب تسليط الضوء على النقاط الحرجة في إنتاج الأغذية الحيوانية ومن اجل الحد من خطورتها على صحة المستهلك ووضع الحلول المناسبة لمعالجتها.

شكر وتقدير

تم دعم البحث من قبل كلية الطب البيطري /جامعة الموصل فلها جزيل الشكر والتقدير.

المصادر

1. Popelka P, Nagy J, Marcincak S, Rozanska H, Sokol J. Comparison of sensitivity of various screening assay and liquid chromatography technique for penicillin residue in milk. Bull Vet Inst Pulawy.2004;48:273-276.
٢. مللي , حازم. ثمالات الادوية والهرمونات وصحة المستهلك. مجلة سافكو العلمية ٢٠٠٦;٢: ٢٨- ٣١.
3. Suhren G, Reichmuth J, Walte HG. Detection of betalactam antibiotics in milk by the Pezym test. Milchwissenschaft. 1996;51:269-273.
4. Barza M, Scheife RT. Antimicrobial spectrum, pharmacology and therapeutic use of antibiotics. Am J Hosp Pharm. 1977;34:723–737.
5. Arnold D, Somogyi A.Trace analysis of chloramphenicol resides in eggs, milk and meat: comparison of gas chromatography and radioimmunoassay. J AOAC. 1985;68:984-990.
6. Ziv G, Sulman FG. Distribution of aminoglycoside antibiotics in blood and milk. Res Vet Sci.1974;17:68-74.
7. Manners JG, Stewart R. Presence of dihydrostreptomycin and penicilin in cows milk following intrauterine administration. Aust Vet J.1982;58 (5): 203-204.
8. Brady MS, Katz SE. Antibiotic/antimicrobial residues in milk. J Food Protect. 1988;51: 8-11.
9. Suhren G. Influences of residues of antimicrobials in milk on commercially applied starter cultures –model trials. Kiel. Milchwirt Forschungsber.1996; 96:131-149.
10. Council Regulation No 2377/90.1990 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official J Europ Union.1990;L224:1-8.
11. Bogaerts R, Wolf F. standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. Die Fleischwirtschaft. 1980;60:672- 674.
12. Loomans EE , Van Wiltenburg J , Koets M , Van Amerongen A. Neaminas an immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin, and neomycin in milk. J Agric Food Chem. 2003; 51:587-593.
13. Isoherranen N, Soback S. Chromatographic methods in the analysis of aminoglycoside antibiotics. J AOAC Int. 1999;82:1017-1045.
١٤.سليمان , نزار حبيب. الكشف عن ثمالات مضادات الجراثيم في حليب الأبقار وتأثيراتها على صحة الإنسان. (رسالة ماجستير) حماة: جامعة البعث, ٢٠٠٩.
15. Sato K, Bennedsgaard TW, Bartlet PC, Erskine RJ, Kaneene JB. Comparison of antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from bulk tank milk in organic and conventional dairy herds in the Midwestern United State and Denmark. J food protect. 2004;67:1104-1110.
16. Moats WA. Inactivation of antibiotics by heating in the food and other substrates- a review. J food protect.1988;51 (6):491-497.
17. Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official J Europ Union.2010;L15:1-72.
18. Doyle MP, Erickson MC. Emerging microbiological food safety issue related to meat.Meat Sci.2006;74:98-112.
19. Gremilogianni AM ,Megoulas NC ,Koupparis MA. Hydrophilic interaction vs ion pair liquid chromatography for the determination of streptomycin and dyhydrostreptomycin residues in milk based on mass spectrometric detection. J chromato A. 2010;1217:6646-6651.
20. Kaya SE, Filazi A. Determination of antibiotic residues in milk samples. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2010;16:S31-S35.
21. Gradinaru AC, Popescu O, Solcan G. Antibiotic residues in milk from Moldavia , Romania. HVM Bioflux.2011;3 (2):133-141.
22. Bilandzic N, Kolanovic BS, Varenina I, Jurkovic Z. Concentration of veterinary drug residues in milk from individual farms in Croatia. mljekarstro.2011;16 (3):260-267.