الكشف عن ثمالات الفلورفنيكول والتولترازوريل في عينات كبد الفروج المجمّعة من محلات بيع الفروج في مدينة اللاذقية- سورية

د. علي نيصافي*
د. توفيق دلّا**
د. عبد الكريم حلّاق***
عبد اللطيف شريف****

(تاريخ الإيداع 3 / 1 / 2021. قبل للنشر في 19 / 4 / 2021)

□ ملخّص □

هدفت الدراسة الى الكشف عن محتوى كبد الفروج من الفلورفنيكول والتولترازوريل ومقارنة هذه النتائج مع الحدود القصوى للثمالات (MRLs) المسموح بها محلياً وعالمياً لتقدير أمان وصلاحية استهلاكه البشري.

تم جمع 96 عينة عشوائية من كبد الفروج من أسواق مدينة اللاذقية خلال عام 2018، وتم استخلاصها وتحليلها باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) في مخابر وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي بدمشق.

بيّنت النتائج ارتفاعاً في مستويات الفلورفنيكول والتولترازوريل في العينات حيث راوحت بين (249.71- 3842.58) و(22.16- 884.35) µg/kg، على التوالي، واحتوت 75 و100% من العينات على ثمالات من هذين المركبين، وتجاوزت 16.7 و20.8% من العينات الإجمالية الحد الأقصى المسموح به لثمالات الفلورفنيكول والتولترازوريل، على التوالي، ما يستدعي ضرورة وجود مراقبة صارمة لمحتوى الصادّات الحيوية في لحوم الفروج قبل طرحها للاستهلاك البشري.

ويشير التحليل الإحصائي الى فروق معنوية $P \leq 0.05$ عند مقارنة متوسط تركيز الفلورفنيكول والتولترازوريل في العينات التي تم جمعها في الربع الثالث بمتوسط تراكيزه في الأرباع الأخرى، ولم تسجل فروق معنوية $P>0.05$ عند مقارنة متوسط التراكيز لباقي الأرباع (الأول والثاني والرابع) ببعضها البعض.

الكلمات المفتاحيّة: ثمالات- الفلورفنيكول- التولترازوريل- كبد الفروج

* **أستاذ - قسم الإنتاج الحيواني- كلية الزراعة بجامعة تشرين- سورية**
** **أستاذ - قسم الإنتاج الحيواني- كلية الزراعة بجامعة تشرين- سورية.**
*** **مدرس - كلية الطب البيطري - جامعة حماه- سورية**
**** **طالب دكتوراه -قسم الإنتاج الحيواني- كلية الزراعة -جامعة تشرين- سورية.**

Detection of Florfenicol and Toltrazuril residues in broiler liver samples collected from Latakia markets – Syria

Dr. Ali Nisafi[*]
Dr. Tawfik Dalla[**]
Dr. Abdulkarim Hallak [***]
Abdullatif Charif[****]

(Received 3 / 1 / 2021. Accepted 19 / 4 /2021)

□ ABSTRACT □

The study aimed to detect the content of broiler liver from Florfenicol and Toltrazuril residues, and compare results with the maximum residue limits (MRLs) allowed locally and internationally, to assess the safety of its human consumption.

96 random samples of broiler liver were collected from markets of Latakia during 2018, and they were extracted and analyzed using high-performance liquid chromatography instrument in laboratories of the Ministry of Agriculture in Damascus.

The results showed an increase in the levels of Florfenicol and Toltrazuril in samples, as they ranged between (249.71 -3842.58) and (22.16 -884.35) µg/ kg, respectively, 75 and 100% of the samples contained residues of these two compounds, 16.7 and 20% of the total samples exceeded the MRL in broiler livers. This necessitates the necessity of strict monitoring of the antibiotic content in chicken meat before it is put up for human consumption.

Statistical analysis indicates significant differences $P \leq 0.05$ when comparing mean of Florfenicol and Toltrazuril in samples of the third quarter with the mean of other quarters. While no differences were recorded when comparing the mean of the remaining quarters with each other.

Keywords: residues, Florfenicol, Toltrazuril, broiler liver.

[*]**Professor , Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Syria.**
****Professor , Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Syria.**
***** Assistant Professor , Faculty of Veterinary Medicine, University of Hama, Syria**
****** PhD student, Animal Production Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Syria**

مقدمة

الصادات الحيوية هي المواد ذات النشاط البيولوجي المضاد للجراثيم وتستخدم لعلاج الأخماج التي تسببها الكائنات الحية الدقيقة، بما في ذلك الفطريات والطفيليات، وتعمل من خلال منع أو تثبيط نمو الكائنات الحية الدقيقة الممرضة، بعضها طبيعي تنتجه الكائنات الحية الدقيقة إلا أن الغالبية العظمى منها يتم إنتاجها الآن صناعياً، وتستعمل في تربية الدواجن للأغراض العلاجية والوقائية مع إمكانية استعمال بعضها كمحفزات للنمو Promoters تعمل على زيادة الإنتاجية ضمن فترة زمنية طويلة قد تمتد لكامل عمر الطيور (WOAH, 2016). وتنتمي الصادات الحيوية إلى نفس المجموعات التي تنتمي اليها تلك المستخدمة في علاج الإنسان أو أنّ لها نفس آلية العمل مما يجعل الفرصة مهيأة لانتقال الجراثيم المقاومة لها إلى الإنسان، أو نشر آليات المقاومة الخاصة بها الأمر الذي يتسبب بفقدان الفعالية العلاجية ولكثير من الأدويةDiarra and Malouin, 2014)) ، وتختلف طريقة إعطائها تبعاً لمرحلة ونوع الإنتاج وخطر الإصابة بالأمراض، وتضاف الى الأعلاف أو مياه الشرب أو تعطى عن طريق الحقن كمركب واحد، أو كخليط من مركبات عدّة تتآزر مع بعضها البعض لتصبح أكثر فاعلية ضد مجموعة متنوعة من الأمراض، وقد يؤثر استخدام أحدها في فاعلية الأنواع الأخرى ويحدث نوع من التضاد فيما بينها (Veerapandian *et al.,* 2013).

وتشكل لحوم الدواجن بديلاً عن اللحوم الحمراء لمواصفاتها الغذائية المتميزة واحتوائها على نسبة عالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة ومستوى منخفض من الكولسترول، وطعم محبب وسهولة في التحضير وسعر منخفض مناسب لشرائح اجتماعية كبيرة، ويحتوي الكبد على مستوى مرتفع من الفيتامين B12 الضروري لصحة الجهاز العصبي والعضلات ولعلاج حالات فقر الدم، إضافة الى مجموعة من الفيتامينات والمعادن الضرورية للكثير من العمليات البيولوجية والمناعية (Givens, 2009). وترافق ازدياد الطلب على هذه اللحوم مع التوسع في هذه الصناعة وأدى استعمال كميات كبيرة ومتنوعة من الصادّات الحيوية وإعطاء جرعات غير مناسبة منها دون التقيد بفترة السحب Withdrawal Period بتراكم ثمالات منها Residues في أنسجة ومنتجات هذه الطيور ما أدى الى انخفاض جودة لحومها ومنتجاتها (Mehtabuddin *et al.,* 2012). وتتركز الثمالات في أعضاء الكبد والكلى بدرجة أكبر مما هي عليه في العضلات (Wijayanti and Rosetyadewi 2011). وقد حظرت منظمة الصحة العالمية استخدام بعض الصادات الحيوية وقيدت استخدام بعضها الآخر تجنباً لحدوث المقاومة الدوائية (WHO, 2015). واعتمد الاتحاد الأوروبي (EU 37/2010) حدوداً قصوى لمستواها في اللحوم والمنتجات الحيوانية Maximum (MRLs) Residues Limits، وكذلك قامت هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية بإصدار المواصفة (SASMO, 3605/2011) التي تنظم محتوى المنتجات الحيوانية منها، واعتمدت (2500 و600 µg/kg) كحد أقصى يجب عدم تجاوزه لثمالات الفلورفنيكول والتولترازوريل في كبد الدواجن، على التوالي، واعتبر الكبد آمناً للاستهلاك البشري بعد فترة سحب مقدارها خمسة أيام للفلورفنيكول عند جرعة 30 ملغ/ كغ من وزن الجسم، وسبعة أيام عند 60 ملغ/ كغ (Rasheed and Fakhre, 2017) وبعد ثمانية أيام للتولترازوريل (Soliman, 2015).

ينتمي **الفلورفنيكول Florfenicol** الى مجموعة Amphenicols وهو صاد واسع الطيف يستخدم ضد أنواع مختلفة من الجراثيم السالبة والموجبة لغرام، وقد منحه وزنه الجزيئي المنخفض خاصية الامتصاص السهل من الأنسجة وأكسبه حركية دوائية متفوقة على كثير من مضادات الجراثيم الأخرى، ويصل التركيز الأقصى له في الدم بعد 1– 5 ساعات ما يعطيه أهمية كبيرة في علاج أمراض الجهاز الهضمي والتنفسي كالسالمونيلة والإشريكية القولونية وهو نظير

هيكلي للتيامفنيكول والكلورامفنيكول تم تطويره بإضافة ذرة فلور (White *et al.,* 2000) منحته فاعلية في العلاج أكبر منهما وعند جرعات أقل وضد العديد من السلالات المقاومة للتيامفنيكول والكلورامفنيكول Marca *et al.,* (1984).

ويعمل الفلورفنيكول بنفس الآلية التي يعمل بها التيامفنيكول والكلورامفينيكول على تثبيط تخليق البروتين الجرثومي (الريبوسوم 7) ويختلف عن الكلورامفينيكول الذي تم حظر استخدامه بسبب تأثيره المميت وتسببه بفقر الدم اللاتنسجي (Aplastic Anemia) وسميّة نخاع العظم بتحقيقه شروط السلامة الصحية ما أدى الى استعماله الواسع لدى الدواجن (Wareham and Wilson, 2002).

أما **التولترازوريل** فهو أحد أهم مضادات الكوكسيديا من مجموعة Triazinetrione، ونتيجة للاستخدام الواسع لمضادات الكوكسيديا في صناعة الدواجن يتم تصنيفها أحياناً على أنها (صادات حيوية). يعمل التولترازوريل على تثبيط إنزيمات الجهاز التنفسي للطفيل، والإنزيمات المشاركة في تخليق البيريميدين، ويستعمل على نطاق واسع في الوقاية والعلاج من الطفيليات التي تتسبب بها الكائنات الدقيقة جنس Eimeria، وهو فعال ضد جميع مراحل تطورها في الأمعاء ولأنواع كثيرة منها: Eimeria Tenella, E Necatrix, E Acervulina, E Maxima. والتي تصيب الأنسجة الطلائية المعوية للطيور، وتتسبب بالإسهال والنزف المعوي، ما ينجم عنه انخفاض في الوزن وفي معدل تحويل الأعلاف وتراجع في إنتاج البيض وارتفاع في معدل النفوق (Zhao *et al.,* 2018)، ويعطى مع مياه الشرب بسبب فقدان الطيور المصابة الشهية لتناول الأعلاف، ويتسبب الاستعمال الزائد له بتراكم ثمالات منه في المنتجات الحيوانية، وبمخاطر جمّة على الصحة، ويؤدي الاستعمال لفترات طويلة إلى تطوير سلالات مقاومة له (Abbas *et al.,* 2008).

وأظهرت الدراسات تراكماً لثمالات الفلورفنيكول والتولترازوريل في كبد الفروج بمستويات تفوق في كثير منها الحدود الآمنة في الباكستان (Nasim *et al.,* 2016). والعراق (Rasheed and Fakhre, 2017). وإيران (Attari *et al.,* 2014). وبولندا (Olejnik *et al.,* 2011). وكذلك في الصين (Zhaoling *et al.,* 2014). (ZuHao *et al.,* 2009). (Qi *et al.,* 2007) وكوريا الجنوبية (Kang *et al.,* 2015). وغيرها.

أهمية البحث وأهدافه:

تتسبب ثمالات الصادّات الحيوية بمخاطر صحية كبيرة على الإنسان والحيوان، تتمثل بحدوث السرطانات والطفرات الجينية وأمراض نقي العظام، وبكثير من أشكال الحساسية، ما ينتج عنه خسائر اقتصادية كبيرة، بسبب انخفاض معدلات النمو وارتفاع نسب النفوق وبأضرار صحية متنوعة على الإنسان، وقد تنتقل إليه سلالات جرثومية مقاومة، يضاف الى ذلك تعذّر تسويق المنتجات التي تحتوي على ثمالات منها الى أسواق الكثير من الدول، ويسهم تحديد مدى تراكم الصادّات الحيوية في اللحوم في ضبط استخدام هذه المركبات ما يحسن من جودة وصحة الغذاء.

هدف هذا البحث الى الكشف عن مستويات (الفلورفنيكول والتولترازوريل) في عينات عشوائية من كبد الفروج التي تم جمعها من محلات بيع الفروج في مدينة اللاذقية، وتقييم مدى أمانها للاستهلاك البشري من خلال مقارنة هذه النتائج بالحدود القصوى للثمالات المحددة من قبل هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية.

طرائق البحث ومواده:

أ- العينات وموقع تنفيذ التجربة: تم جمع عينات عشوائية من كبد الفروج من محلات بيع اللحوم المنتشرة في كامل المساحة الجغرافية لمدينة اللاذقية، للكشف عن محتواها من الفلورفنيكول والتولترازوريل خلال عام 2018 وفقاً لما يلي:

- 96 عينة من كبد الفروج تم جمعها بمعدل ثمان عينات في كل شهر وذلك على امتداد العام (8*12=96).
- تم دمج كل أربع عينات من كل شهر مع بعضها البعض لتكون عينة واحدة، وليكون مجموع العينات التي سيتم تحليلها في كل شهر عينتين.
- قسّمت السنة لأربع أرباع كل منها ثلاثة أشهر، فيكون عدد العينات التي ستحلل في كل ربع ست عينات.

وتعطي العشوائية في اختيار العينات على مدى عام كامل يشمل مختلف الظروف البيئية وما يرتبط بها من أمراض تستدعي استخدام الصادّات الحيوية وغيرها من العقاقير، صورة حقيقية عن الواقع الصحي لكبد الفروج المستهلك في المدينة وتم وضع كل عينة (بعد الدمج) في كيس نايلون مدعم بآلية إغلاق وحفظها في حافظة مبردة وإرسالها الى المختبر لتحفظ بدرجة حرارة -18 مئوية لحين البدء بعمليات الاستخلاص. وكان مخطط عمليات التحليل وفقاً لما هو مبيّن في الجدول (1) التالي.

الجدول (1) مخطط عمليات التحليل للفلورفنيكول والتولترازوريل خلال السنة

الربع	عدد عمليات التحليل للفلورفنيكول	عدد عمليات التحليل للتولترازوريل
الأول (ك2- شباط- آذار)	6	6
الثاني (نيسان- أيار- حزيران)	6	6
الثالث (تموز- آب- أيلول)	6	6
الرابع (ت1- ت2- ك1)	6	6
المجموع	24	24
	48	

ب- المواد والأجهزة المستخدمة في التحليل: جميع المحلّات العضوية والمواد الكيميائية التي استخدمت كانت من انتاج شركة Merck الألمانية وذات نقاوة عالية من الصنف (HPLC- grade) تناسب إجراء هذا النوع من التحاليل، أما المواد المعيارية لكل من الفلورفنيكول والتولترازوريل فكانت من انتاج شركة Sigma وبتركيز 100%. واستخدم جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC من انتاج شركة Shimadzu اليابانية ذو الطراز LC20، وتمت عملية الفصل باستخدام العمود الكروماتوغرافي C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) صنع شركة Supelco Analytical، وكانت جميع الأجهزة والمعدات الأخرى التي استخدمت في عمليات الاستخلاص والتحليل ذات دقة عالية، وتم اجراء التحاليل في مخابر وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي بدمشق.

ج- استخلاص وتحليل الفلورفنيكول: اعتمدت طريقة (Sniegoski *et al.,* 2011) في استخلاص الفلورفنيكول، وذلك بأخذ 5 غ عينة مطحونة بشكل جيد ووضعها في أنبوب تثقيل 50 مل، وأضيف اليها 10 مل اثيل أسيتات ورجّها بشكل جيد وتثقيلها على سرعة 3500 دورة/ دقيقة، لمدة 10 دقائق، أخذت بعد ذلك الطبقة العلوية وتم

تبخيرها بغاز النيتروجين، وغسل المتبقي بـ 10 مل ماء مؤين، وأضيف للمحلول 10 مل هكسان لإزالة الدهون مرتين وتم تمرير الباقي على عمود الفصل Cartrage (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) المهيأ لذلك بعد تنشيطه بإمرار 5 مل ميثانول ومن ثم 50 مل ماء مؤين من خلاله بعد ذلك مررت العينة وغسل عمود الفصل بـ 6 مل ماء مؤين، ثم 30 مل من الميثانول 30% وتم شطف العينة بـ 3 مل من الميثانول 60% وتمديدها بـ 5 مل ماء ثم مررت كمية 8 مل من المادة المشطوفة على عمود فصل ثان بعد تنشيطه بنفس الطريقة السابقة، وتم شطفها بـ 3 مل ميثانول لتصبح العينة جاهزة للحقن في جهاز HPLC.

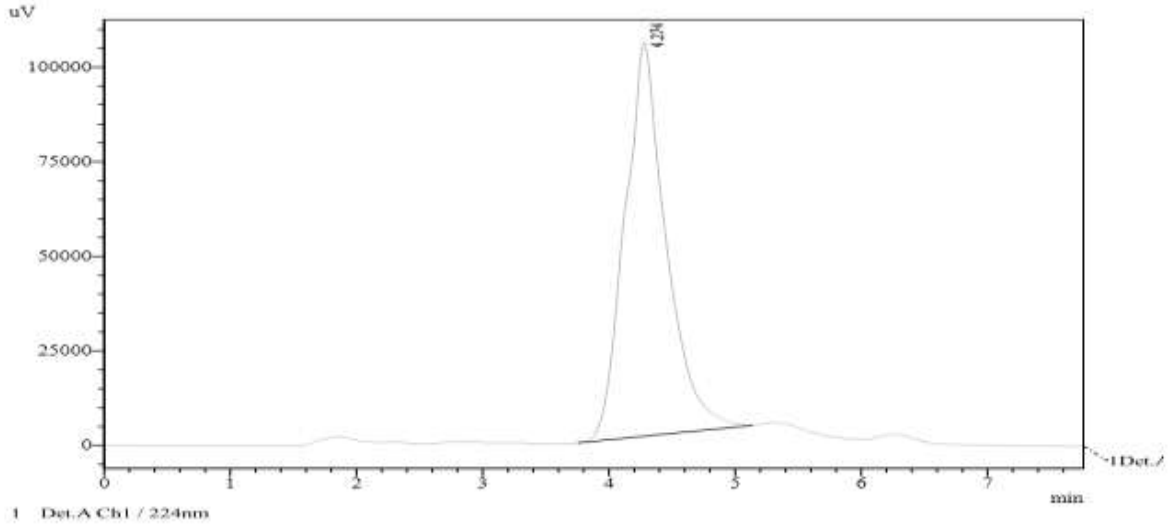
اعتمد في التحليل نظام Isocratic، واستخدم فيه عمود الفصل C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) وطور متحرك ناتج عن مزج الميثانول والماء وحمض الخل (45 و55 و0.1) بتدفق 1 مل/دقيقة، ودرجة حرارة عمود 40 مئوية، وطول موجة 224 نانومتر، وحضر المحلول المعياري للفلورفنيكول تركيز 50 ميكروغرام/مل،

د- استخلاص وتحليل التولترازوريل: اعتمدت طريقة (Buiarelli *et al.,* 2017) في استخلاص التولترازوريل، وذلك بأخذ 5 غ من عينة مفرومة ومتجانسة بشكل حيد في أنبوب تثفيل 10 مل أضيف اليها 5 مل أسيتونتريل، ثم وضعت على الرجّاج لمدة 5 دقائق ثم على جهاز الخلط الدوامي Vortex لمدة 15 دقيقة ثفلت بعد ذلك على سرعة 4000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق، ثم أخذ الجزء الطافي ومدد بـ 25 مل من الماء المؤين ثم مرر على عمود الفصل C18 (Cartrage) المنشط بـ 3 مل ميثانول ثم 3 مل ماء وبعد تمرير العينة تم غسل العمود بـ 5 مل ماء لمرتين ثم شطف بـ 5 مل ميثانول 5% ثم بخر بغاز النيتروجين حتى تمام الجفاف، وحل المتبقي بـ 1 مل أسيتونتريل 70%، لتصبح العينة جاهزة للحقن والتحليل على جهاز HPLC.

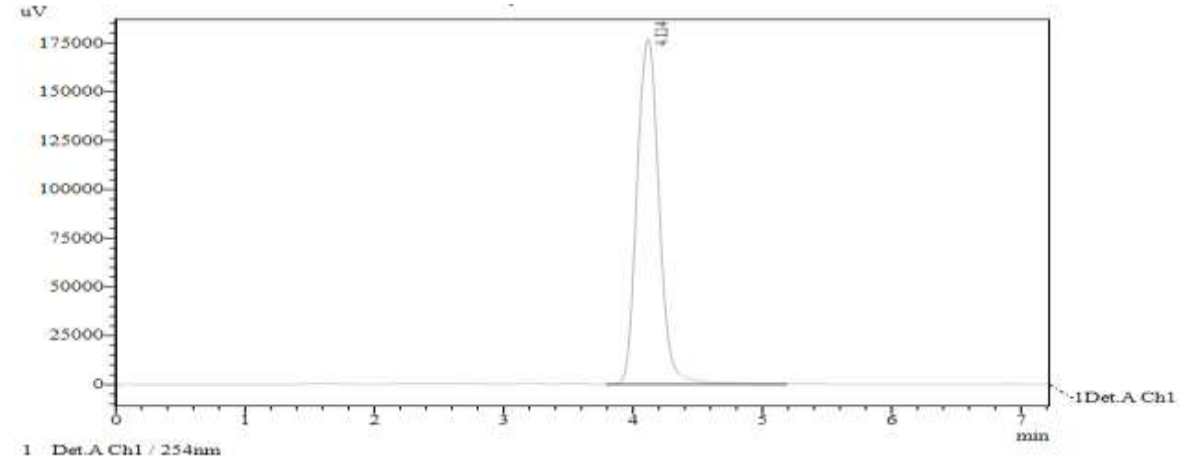
وتمت عملية التحليل عند موجة بطول 254 nm ، ودرجة حرارة فرن العمود 40 مئوية وتدفق 1 مل/ دقيقة وكان حجم الحقن: 10 ميكرولتر وباستخدام العمود C18 كطور صلب أما الطور المتحرك فكان (ماء) 20: (أسيتونتريل) 80، وتم تحضير المحلول المعياري للتولترازوريل بتركيز 50 ميكروغرام/ مل.

هـ- مردود طريقة الاستخلاص: تم تحديد مردود طريقتي الاستخلاص (Sniegoski *et al.,* 2011) و(Buiarelli *et al.,* 2017) المتبعتين لكل من الفلورفنيكول والتولترازوريل، وذلك بإضافة 100 ميكروغرام من الفلورفنيكول و100 ميكروغرام من التولترازوريل الى كبد فروج مأخوذ من مزارع لم تستخدم فيها أي من مركبات هذين الصادين (شاهد)، وتم تطبيق عملية الاستخلاص بكامل مراحلها عليها ولكل مادة، فكانت نسبة الاسترجاع Recovery للفلورفنيكول 93.10%، وللتولترازوريل 91.89%، وهي نسب جيدة تعطي ثقة بطريقة الاستخلاص والتحليل المطبقة.

و- التحليل على جهازHPLC: بعد ذلك تم حقن كمية من الفلورفنيكول والتولترازوريل المعياريين بشكل منفرد لمعرفة زمن الاحتباس الخاص بكل منهما على حده، ثم حقن مزيج من المركبين معاً بتركيز 50 ميكروغرام/ مل لكل منهما عدة مرات، فكان زمن الاحتباس للفلورفنيكول 4.274 دقيقة وللتولترازوريل 4.114 دقيقة. وفقاً لما يوضحه الشكل (1) والشكل (2) التاليين:

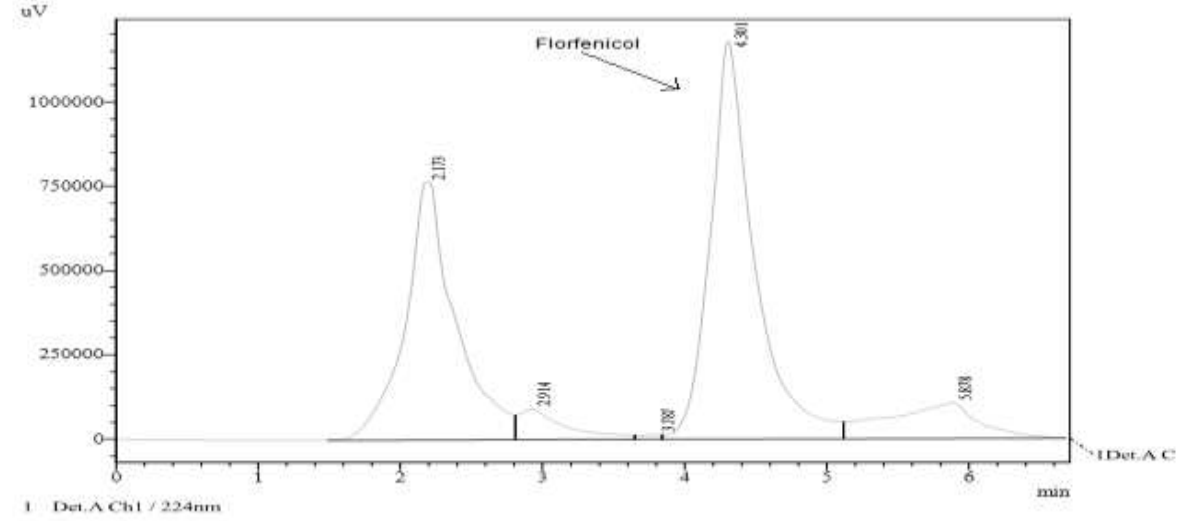


الشكل (1) كروماتوغرام المادة المعيارية للفلورفنيكول (4.274 د)

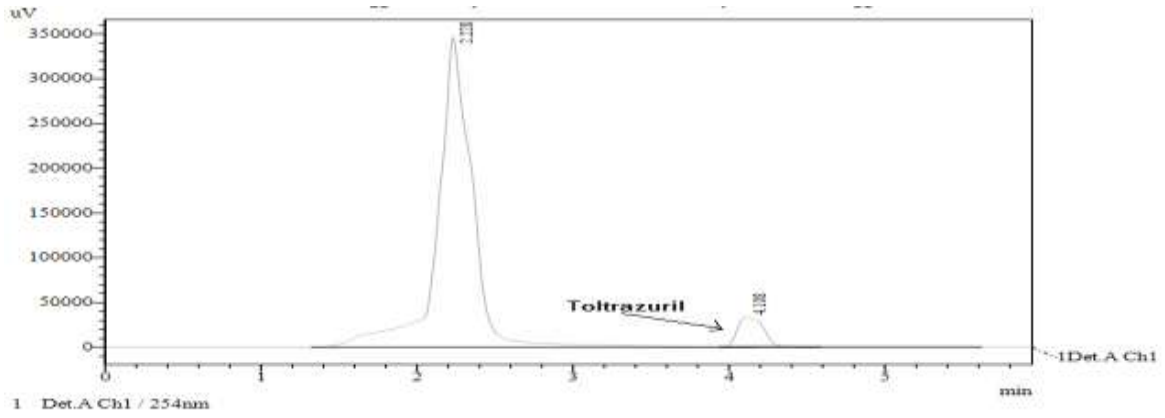


الشكل (2) كروماتوغرام المادة المعيارية للتولترازوريل (4.114 د)

أما الشكلين (3) و(4) فيبينان كروماتوغرام ثمالات الفلورفنيكول والتولترازوريل في عينة من عينات الكبد



الشكل (3) كروماتوغرام ثمالات الفلورفنيكول في عينة كبد (4.301 د)



الشكل (4) كروماتوغرام ثمالات التولترازوريل في عينة كبد (4.108 د)

وقد تم حساب التراكيز في العينات وفق المعادلة التالية:

تركيز المادة في العينة µg/kg= تركيز الستاندرد (المعيار) µg/kg* (مساحة ذروة العينة/ مساحة ذروة الستاندرد)* (حجم المستخلص النهائي مل/ وزن العينة غ).

ز- التحليل الإحصائي استخدم البرنامج Statistical Program for Social Sciences (SPSS 18) لمقارنة الفروق المعنوية ذات الدلالة الإحصائية LSD بين المتوسطات عند مستوى معنوية 5 %.

النتائج والمناقشة

أ- محتوى العينات من الفلورفنيكول: تم تقدير محتوى العينات من الفلورفنيكول، وكانت النتائج ايجابية في 75% منها وتجاوزت 16.7% من العينات MRL، ويبين الجدول (2) القيم التي تم الحصول عليها.

الجدول (2) نتائج الكشف عن ثمالات الفلورفنيكول في عينات كبد الفروج (µg/kg)

الربع الأول (1- 2- 3)		الربع الثاني (4- 5- 6)		الربع الثالث (7- 8- 9)		الربع الرابع (10- 11- 12)	
العينة	الثمالات	العينة	الثمالات	العينة	الثمالات	العينة	الثمالات
1	1079.92	7	ND	13	1414.84	19	1034.05
2	ND	8	ND	14	1791.08	20	2190.36
3	735.50	9	1644.09	15	3842.58	21	ND
4	1044.95	10	1908.66	16	3100.25	22	457.43
5	254.49	11	ND	17	2516.99	23	508.97
6	ND	12	249.71	18	2532.64	24	546.43
المتوسط	519.14^a	-	633.74^a	-	2533.06^b	-	789.54^a
الانحراف المعياري	499.36	-	894.26	-	876.09	-	760.73

a, b تدل الحروف المختلفة على وجود فروق معنوية $P\leq0.05$ بين الأرباع، والمتشابهة على عدم وجود فروق $P>0.05$ بينها

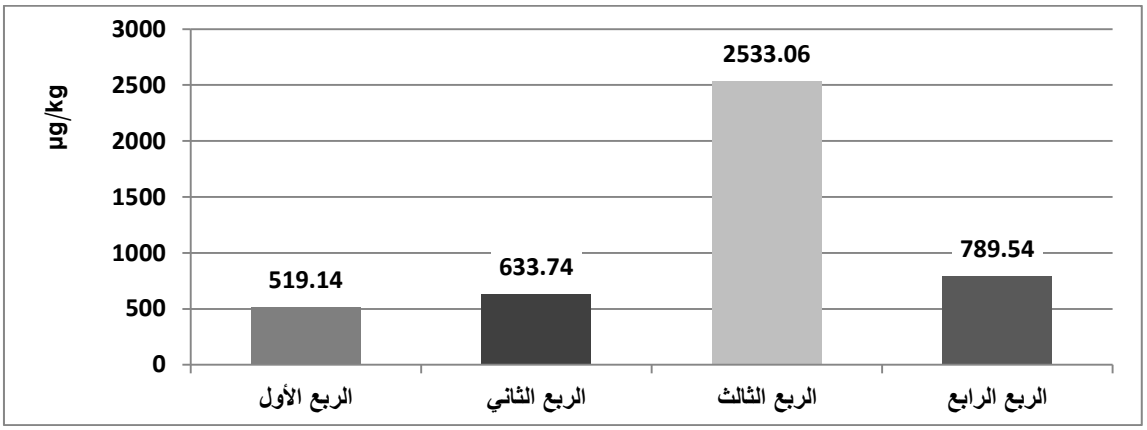
ND (Not detected) اقل من حدود الكشف

يتضح من الجدول (2) أنعدد العينات التي احتوت على ثمالات من الفلورفينيكول قد بلغ 18 عينة أي ما نسبته 75% من إجمالي العينات المختبرة، في حين كانت ثمالات هذا الصاد في ست عينات (25% من العينات) أقل من حدود الكشف، وتجاوزت 4 عينات (16.7%) الحد الأقصى المسموح به من ثمالات هذا الصاد في نسيج الكبد (2500 ميكروغرام/ كغ) وكانت جميعها من عينات الربع الثالث، وسجلت العينة (15) من عينات الربع الثالث أعلى مستوى له في العينات 3842.58 ميكروغرام/ كغ، تلتها العينة (16) وبتركيز 3100.25 ميكروغرام/ كغ. وكانت جميع عينات الربع الثالث 100% ايجابية لوجود هذا الصاد.

بلغ متوسط ثمالات الفلورفنيكول في العينات الايجابية 1491.83 ميكروغرام/ كغ، وكان المتوسط العام لثمالاته في جميع العينات المختبرة أقل من MRL، وبمستوى بلغ 1118.87 ميكروغرام/ كغ.

أعلى المتوسطات سجل لعينات الربع الثالث 2533.06، متجاوزاً الحد الأقصى المسموح به من ثمالات هذا الصاد في كبد الدواجن، وكانت متوسطات الربع الأول والثاني والرابع أقل من MRL.

وتجاوز متوسط مستوى الفلورفنيكول في عينات الربع الثالث بحوالي خمسة مرات، متوسط القيم المسجلة في الربع الأول، وبأربع مرات متوسط القيم المسجلة خلال الربع الثاني وبثلاث مرات متوسط القيم المسجلة في عينات الربع الرابع. ويبين المخطط (1) متوسط القيم المسجلة لمستويات الفلورفنيكول في عينات الكبد خلال الأرباع.



المخطط (1) متوسط ثمالات الفلورفنيكول في عينات كبد الفروج µg/kg

ويشير التحليل الإحصائي الى وجود فروق معنوية $P \leq 0.05$ عند مقارنة متوسط النتائج التي تم الحصول عليها في الربع الثالث بالمتوسط الذي تم الحصول عليه في باقي الأرباع، في حين لم تسجل فروق معنوية عند مقارنة متوسط تراكيز الفلورفنيكول في عينات الأرباع الأول والثاني والرابع ببعضها البعض.

وبمقارنة النتائج التي تم الحصول عليها لمستويات الفلورفنيكول في كبد الفروج موضوع الدراسة مع النتائج التي توصلت إليها دراسات سابقة، يتبين أنها تقل عن تلك المسجلة في الباكستان والتي بيّنت احتواء 84% من عينات كبد الفروج المختبرة على ثمالات من الفلورفنيكول وتجاوزت مستوياته في 42.6 % من العينات الحد الأقصى المسموح به وكان متوسط تركيزه في العينات 2585.44± 1759.71 µg/kg (Nasim *et al.,* 2016).

وتقل النتائج عن تلك المسجلة في العراق في دراسة أجريت لدراسة العلاقة بين وزن الذبائح ومحتواها من الفلورفنيكول بينت أن مستوى الفلورفينيكول في العضلات والكلى والكبد كان أقل من MRLs لدى الفراريج بوزن 2 كغ، وأعلى من MRLs في الكبد والكلى فقط عند فروج بوزن 3 كغ، بينما كان أعلى من MRLs في الأنسجة العضلية

والكلى والكبد للفراريج بوزن 4 كغ (Rasheed and Fakhre, 2017). مع الإشارة الى أن هذه الدراسة لم تقم بوزن الطيور التي أخذت منها العينات إلا أن أوزانها التقريبية كانت 2- 3 كغ.

وأظهرت دراسة أجريت في إيران للتحري عن ثمالات الكلورامفينيكول في عضلات صدر وفخذ وكبد دجاج التسمين (35 فخذ، 35 صدر و20 كبد) تم جمعها من أسواق مدينة تبريز احتواء 31% من العينات (28 عينة) على ثمالات من الكلورامفينيكول 8 عينات من أنسجة الكبد راوحت تراكيزه فيها بين (0.001- 0.024 µg/kg)، رغم الحظر المشدّد على استخدامه (Attari *et al.,* 2014).

ب- محتوى التولترازوريل في العينات: تم تقدير محتوى التولترازوريل في العينات وكانت النتائج ايجابية في جميع العينات المختبرة وتجاوزت 20.8% من العينات الحد الأقصى المسموح به لثمالات التولترازوريل في نسيج الكبد ويبين الجدول (3) التالي نتائج التحليل التي تم الحصول عليها.

الجدول (3) نتائج الكشف عن ثمالات التولترازوريل في عينات كبد الفروج (µg/kg)

الربع الأول (1- 2- 3)		الربع الثاني (4- 5- 6)		الربع الثالث (7- 8- 9)		الربع الرابع (10- 11- 12)	
العينة	الثمالات	العينة	الثمالات	العينة	الثمالات	العينة	الثمالات
1	564.03	7	337.10	13	534.63	19	74.48
2	692.15	8	138.34	14	516.12	20	86.98
3	169.13	9	172.53	15	625.60	21	112.62
4	111.00	10	688.54	16	**884.35**	22	80.53
5	**22.16**	11	88.61	17	480.45	23	129.96
6	48.24	12	484.31	18	688.40	24	168.04
المتوسط	267.78^{a}	-	318.23^{a}	-	621.59^{b}	-	108.76^{a}
الانحراف المعياري	286.59	-	232.97	-	149.75	-	35.84

a, b تدل الحروف المختلفة على وجود فروق معنوية $P\leq 0.05$ بين الأرباع

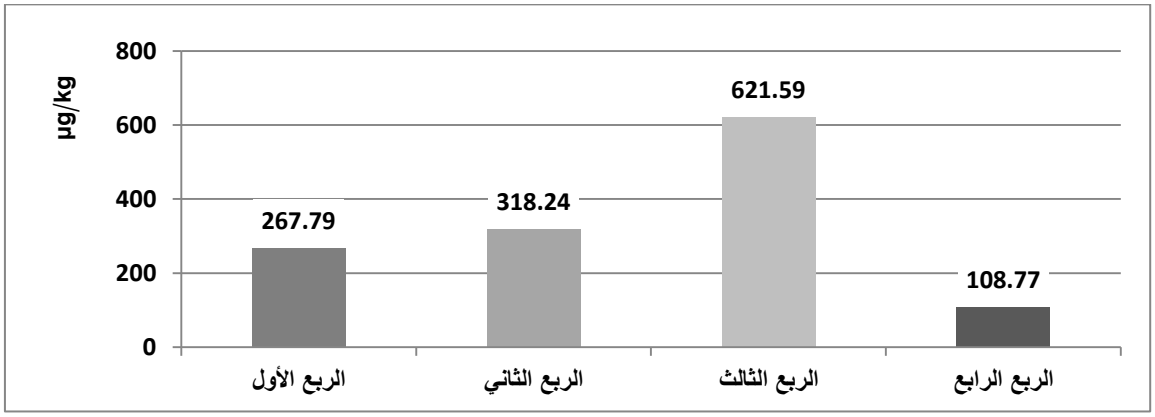
a, b تدل الحروف المتشابهة على عدم وجود فروق معنوية $P>0.05$ بين الأرباع

يتضح من الجدول (3) أن جميع العينات المختبرة 100% كانت ايجابية لوجود هذا الدواء (التولترازوريل) ما يشير الى الاستخدام الواسع له في مراحل التربية المختلفة وذلك نتيجة لضرورة حقيقية لهذا الاستخدام لدى قطعان الدواجن التي أخذت منها العينات والتي تربى جميعها على الأرض ما يسهل من سرعة انتشار وتفشي طفيل الكوكسيديا عبر مكونات الفرشة، وقد يكون الاستخدام مفرطاً لدى بعض المزارع نتيجة للخوف على سلامة القطيع وتجنباً للخسائر الاقتصادية التي يتسبب بها هذا المرض، ما يجعل فترة السحب المحددة بـ (8 أيام) غير كافية.

وقد تجاوزت 20.8% من العينات (5 عينات) الحد الأقصى المسموح به من ثمالات التولترازوريل في كبد الدواجن (600 ميكروغرام/ كغ) ثلاث منها من عينات الربع الثالث. وحققت العينة (16) أعلى تركيز له في العينات المختبرة 884.35 ميكروغرام/ كغ تلتها العينة (2) من عينات الربع الأول 692.15 ميكروغرام/ كغ، وسجلت العينة (5) أدنى تركيز له بين العينات 22.16 ميكروغرام/ كغ.

وكان متوسط تركيز التولترازوريل في العينات المسجلة لنسب تفوق الحد الأقصى الموصى بعدم تجاوزه 715.81 ميكروغرام/ كغ، وبلغ المتوسط الإجمالي لتركيزه في جميع العينات المختبرة 329.09 ميكروغرام/ كغ.

أعلى المتوسطات سجل للعينات المأخوذة خلال الربع الثالث 621.59 ميكروغرام/ كغ وتجاوزت قيمته MRL وتجاوزت قيمة هذا المتوسط بمرتين تقريباً متوسط المستويات المسجلة في الربعين الأول والثاني، وبـ 5.71 مرة متوسط القيم المسجلة خلال الربع الرابع. وكانت قيمة المتوسطات المسجلة لعينات الربع الأول والثاني والرابع أقل من الحد الأقصى المسموح به لثمالات التولترازوريل في نسيج كبد الدواجن، ويبين المخطط (2) متوسط تراكيز التولترازوريل في عينات كبد الفروج



المخطط (2) متوسط تراكيز التولترازوريل في عينات كبد الفروج (µg/kg)

ويشير التحليل الإحصائي للنتائج الى وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية $P \leq 0.05$ عند مقارنة متوسط تركيز التولترازوريل في العينات التي تم جمعها في الربع الثالث بمتوسط تراكيزه في العينات التي تم جمعها في باقي الأرباع في حين لم تسجل أي فروق معنوية $P>0.05$ عند مقارنة متوسط التراكيز لباقي الأرباع (الأول والثاني والرابع) ببعضها البعض.

وقد بينت الدراسات تراكماً لثمالات مضادات الكوكسيديا في أنسجة ومنتجات الدواجن، وتشير المقارنة الى ازدياد القيم المسجلة في هذه الدراسة عن تلك المسجلة في شنغهاي بالصين في دراسة أجريت للتحديد المتزامن لثمالات التولترازوريل ومستقلبيه تولترازوريل سلفون وتولترازوريل سلفوكساید، في عضلات وكبد وكلى كل من الفروج والخنزير، اذ راوحت مستويات التولترازوريل ومستقلبيه في جميع الأنسجة المختبرة بين 10– 37.5 µg/kg (Zhaoling *et al.,* 2014). وتزيد عن القيم المسجلة في الصين في دراسة أجريت للكشف عن ثمالات الديكلازوريل والتولترازوريل، في الأنسجة العضلية وفي كبد وكلى الفروج والتي كانت مستويات كل من المركبين فيها 5 و4 µg/kg، على التوالي (ZuHao *et al.,* 2009). وتزيد أيضاً عن تلك المسجلة في الصين في دراسة بينت أن حدود الكشف المتزامن عن الديكلازوريل والتولترازوريل وفق تقنيتين مختلفتين في القياس لم تتجاوز الـ 15 µg/kg في الكبد والكلى ولكلتا الطريقتين المتبعتين (Qi *et al.,* 2007).

وتزيد عن تلك المسجلة في كوريا الجنوبية والتي بينت وجود تراكيز من التولترازوريل ومستقلبيه تولترازوريل سلفون وتولترازوريل سلفوكساید في عينات من كبد الفروج بمستويات 161–469 و67–1822 و209–760 µg/kg على التوالي، وكانت العينات الايجابية 2 من أصل 2 مختبرة للتولترازوريل و26 من أصل 29 للتولترازوريل سلفون و3 من أصل 3 للتولترازوريل سلفوكساید (Kang *et al.,* 2015). وتزيد عن تلك المسجلة في بولندا، في دراسة أجريت

للتحري عن الكوكسيديوستات في عينات من كبد الفروج والبيض ومياه الشرب والأعلاف وبينت النتائج تراكيزاً تفوق MRLs لثمالات النيكاربازين واللازالوسيد والمادورواميسين، وتم اكتشاف السالينومايسين والمادورامايسين والروبيندين في 77 عينة (53 عينة من كبد الفروج، و23 عينة من البيض، وعينة واحدة من كبد الديك الرومي)، وأظهرت (31 %) من عينات الأعلاف ايجابية لوجود هذه المركبات، ما يؤكد أن تلوث الأعلاف قد يكون سبباً في حدوث ثمالات الكوكسيديوستات في الغذاء (Olejnik *et al.,* 2011).

المناقشة:

يعزى وجود العينات الخالية من ثمالات الفلورفنيكول، الى عدم استعمال المربين لمركبات هذا الصاد في المزارع التي أخذت منها العينات نتيجة لعدم تعرضها للأمراض التي يستدعي علاجها استخدامها، أو استخدام صادات أخرى بديلة في العلاج، يضاف الى ذلك احتمال أن تكون هذه المركبات قد استخدمت في مراحل التربية الأولى ما سمح باستقلاب ونفاذ مستوياتها من الأنسجة وبشكل كامل.

ويعود تركز الفلورفنيكول والتولترازوريل في عينات الكبد المختبرة بمستويات تفوق الحدود المسموح بها MRLs الى عدم تطبيق المربين فترات السحب المحددة لهذين الصادّين أو أنها غير كافية في ظل استخدام جرعات عالية منهما مع قصر الدورة الإنتاجية لفروج اللحم، ربما لعدم المعرفة بمخاطر بقاء هذه الثمالات في اللحوم، أو نتيجة للقلق والتخوف من انتشار الأمراض، وما قد يتسبب به سحب الدواء من نسب نفوق مرتفعة في القطيع، وانخفاض في نسبة التحويل الغذائي وبالتالي خسائر اقتصادية عالية، سيما وأن مدة سحب الفلورفنيكول تعادل أكثر من 15% من عمر الفروج (سبعة أيام)، ومدة سحب التولترازوريل تعادل أكثر من 17% من فترة التربية (ثمانية أيام)، ما يجعل المربين يستمرون بإعطائهما حتى فترة قصيرة من التسويق نظراً لحساسية الطيور العالية في الفترة الأخيرة من التربية للكثير من الأمراض التنفسية وغيرها، ما يجعل من فترة السحب غير كافية لتخفيض مستوى الصادات في الأنسجة الى الحد المقبول، ولا يشكل ذلك عائقاً أمام التسويق في ظل عدم إخضاع لحوم الفروج الى أي نوع من التحاليل للتأكد من توافقها مع الحدود القصوى المسموح بها من الثمالات.

وتؤثر الظروف البيئية بشكل مباشر في انتشار الكثير من الأمراض التي تصيب الدواجن لاسيما تلك المرتبطة بالظروف المناخية وخاصة لدى الحظائر نصف المغلقة صيفاً والتي تشكل نسبة كبيرة من حظائر المنطقة، وقد بينت الدراسات اختلافاً في معدل تراكم ثمالات الصادات في منتجات الطيور المعالجة بين فترة وأخرى، وأظهرت هذه المستويات فروقاً معنوية ($P<0.05$) عند مقارنتها ببعضها البعض خلال الفصول (Ahad *et al.,* 2015)، وتؤثر تقلبات درجات الحرارة والرطوبة في هذا الانتشار ويتسبب انخفاض الرطوبة النسبية في الأسبوع الأول من التربية لأقل من 50% إلى الجفاف والضعف الذي يمتد لأسابيع (Aviagen, 2009) أما الرطوبة النسبية العالية فتتسبب بزيادة رطوبة الفرشة وزيادة تركيز الأمونيا ما يؤثر سلباً في نمو وصحة الفروج خصوصاً مع درجات الحرارة المرتفعة ما يتسبب بسهولة انتشار العدوى ولأمراض كثيرة (Weaver and Meijerhof 1991). كما وتلعب الرطوبة دوراً مهماً في تطور ونمو وانتشار الكثير من الفطريات وكذلك في إنتاج الكثير من السموم الفطرية (Pilar *et al.,* 2012). ما يستدعي استخدام المزيد من العقاقير والصادات الحيوية لأغراض الوقاية والعلاج ويبرر وجود التباين الفصلي في تراكيز هذه الثمالات في العينات موضوع الدراسة والتي بينت أن المستوى الأعلى للفلورفنيكول والتولترازوريل قد سجل في العينات التي تم جمعها خلال الربع الثالث مع ارتفاع معدلات الرطوبة الجوية والحرارة خلال هذه الفترة من السنة

إضافة الى فترات الجفاف التي تتعرض لها المنطقة شهري تشرين أول وتشرين ثاني وما يرتبط بها من أمراض يستدعي علاجها استخدام مركبات هذين الصادين والتي تتسبب وان كانت ضمن الحدود الطبيعية بتأثيرات سلبية في صحة المستهلك وتؤدي الى ظهور المقاومة الدوائية عند سلالات جرثومية كثيرة ما يتسبب بفشل علاج كثير من الأمراض لدى الطيور ولدى الإنسان عند انتقالها إليه عن طريق الغذاء (Antunes *et al.,* 2003).

ويؤثر نمط التربية الأرضية المتبع أيضاً مقارنة بأساليب التربية الأخرى في توافر العوامل والظروف الملائمة لانتشار وتفشي الكوكسيديا وكثير من الأمراض الأخرى نتيجة لانتقال الطفيليات المسببة للعدوى هذه الى الطيور السليمة من خلال تناولها من مكونات الفرشة، ويشكل تناول زرق الطيور المصابة، العامل الأهم في انتشار العدوى بهذا الطفيل ما جعل من القيم المسجلة في هذه الدراسة تزيد عن القيم التي توصلت اليها كثير من الدراسات المرجعية. يضاف الى ذلك تأثر تراكم واستنفاذ بعض الصادات في الأنسجة بتراكيز صادات ومضادات جرثومية أخرى (Vandenberge *et al.,* 2012).

يضاف الى ذلك لجوء كثير من المربين ولأسباب اقتصادية، الى استخدام الصادات الحيوية بشكلها النقي الخام والتي تكون المادة الفعالة فيه مرتفعة مقارنة بذلك المصنع على شكل عقاقير بيطرية مرخصة، وبجرعات غير مناسبة (عالية غالباً)، في ظل توافرها في الأسواق بأسعار منخفضة وعدم مراقبة محتوى المنتجات الحيوانية من هذه المركبات قبل الاستهلاك.

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

- وجود ثمالات من الفلورفنيكول والتولترازوريل في عينات كبد الفروج المختبرة تفوق الحدود المسموح بها وعدم تطبيق فترات السحب المناسبة من قبل المربين تسبب بوجود هذه الثمالات.
- ارتفاع مستوى ثمالات الفلورفنيكول والتولترازوريل في عينات الكبد التي تم جمعها في الربع الثالث من العام مقارنة بالمستوى المسجل منها في عينات باقي الأرباع، يعود ذلك الى ضرورات حقيقية لهذا الاستخدام، وقد يعود الى العشوائية في ذلك.

التوصيات

- التقيد بإجراءات الأمن الحيوي من نظافة وتعقيم قبل البدء بالإنتاج وخلاله.
- عدم استعمال الصادات الحيوية إلا في حالات الضرورة، وتحت إشراف بيطري.
- اعتماد برنامج وطني لمراقبة وتنظيم استعمال الصادات الحيوية.
- التوسع في دراسة تراكم الصادات الحيوية في مختلف منتجات الدواجن وفي الأعلاف ومكونات الفرشة.
- إتباع فترات السحب المناسبة، وتحليل منتجات الدواجن قبل طرحها في الأسواق.
- دعم إنتاج الدواجن العضوية كرديف لهذه الصناعة، والترويج لها كمشاريع أسرية.
- تطوير بدائل آمنة للصادّات الحيوية تسهم إيجاباً في العمليات الاستقلابية، والتحفيز المناعي، وكبح انتشار الأمراض وتقلل من التلوث الجرثومي والإصابة بالأمراض.

Reference:

1. Abbas RZ, Iqbal Z, Khan MN. Identification of Cross-Resistance and Multiple Resistances in Eimeria Tenella Field Isolates to Commonly Used Anticoccidials in Pakistan. Journal of Applied Poultry Research 2008. 17, 361–368.
2. Ahad S, Tanveer S, Malik TA. Seasonal impact on the prevalence of coccidian infection in broiler chicks across poultry farms in the Kashmir valley. J Parasit Dis. 2015 Dec; 39(4): 736–740.
3. Antunes P, Réu C, Sousa JC, Peixe L, Pestana N. Incidence of Salmonella from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbial. 2003, 82, 97–103.
4. Attari V E , Abbasi MM, Abedimanesh N, Ostadrahimi A, Gorbani A. Investigation of Enrofloxacin and Chloramphenicol Residues in Broiler Chickens Carcasses Collected from Local Markets of Tabriz, Northwestern Iran. Health Promotion Perspectives. 2014. 4(2), 151–157.
5. Aviagen. 2009. Ross broiler management manual (2016- 03- 01). http://www.thepoultrysite.com/downloads/single/94/.
6. Buiarelli F, Filippo D, Riccardi C, Pomata D, Giannetti L. Liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of synthetic Coccidiostats in eggs Separations, 4 (2017), p. 15
7. Diarra MS, Malouin F. Antibiotics in Canadian Poultry Productions and Anticipated Alternatives. Frontiers Microbiology 2014, 5, 1–15.
8. EU 37/2010. Commission Regulation No 37/2010 in 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official J of the EU L 15/1.
9. Givens, DI. Animal nutrition and lipids in animal products and their contribution to human intake and health.2009 Nutrients 1: 71-82. UK.
10. Kang J, Park HC, Gedi V, Park SJ, Kim MK. Veterinary drug residues in domestic and imported foods of animal origin in the Republic of Korea. Food Addit Contam 2015 Part B 8:106-112.
11. Marca G, Mattina R, Dubini F, Cocuzza G. In-vitro antibacterial activity of Sch 25393, a fluorinated analogue of Thiamphenicol. J of antimicrobial chemotherapy 1984, Vol 13, Num 5, pp 423-427
12. Mehtabuddin AAM, Ahmad T, Nadeem S, Tanveer ZI, Arshad J. Sulfonamide Residues Determination in Commercial Poultry Meat and Eggs. Journal of Animal and Plant Sciences 2012, 22(2), 473–478.
13. Nasim A, Aslam B, Javed I, Ali A, Muhammad F. Determination of Florfenicol residues in broiler meat and liver samples using RP-HPLC with UV–visible detection. Journal of the science of food and agriculture 2016. DOI 10.1002/jsfa.7220.
14. Olejnik M, Szprengier-Juszkiewicz T, Jedziniak P, Sledzi´nska E, Szymanek-Bany I. Residue control of Coccidiostats in food of animal origin in Poland during 2007–2010. Food Addit. Contam. B 2011, 4, 259–267
15. Pilar MM, Magnoli CE, Chiacchiera SM. Survey of Aspergillus and Fusarium species and their mycotoxins in raw materials and poultry feeds from Córdoba, Argentina. Mycotoxins Research,2012. 28, 111–122.

16. Qi KZ, Shi ZH, Peng K. Simultaneous determination of residues of Diclazuril and Toltrazuril in chicken tissues by matrix solid phase dispersion-high performance liquid chromatography/ultraviolet detection. Anhui Veterinary Workstation, Hefei 230022 Chinese J of Analytical Chemistry 2007-11. VL - 35
17. Rasheed CM, Fakhre NA. Derivative Spectrophotometric Determination of Florfenicol in Chicken Samples. ZANCO J of Pure and Applied Sci. The official scientific journal of Salahaddin University-Erbil ZJPAS 2017, 29 (6); 49-58
18. SASMO (Syrian Arab Standards and Metrology Organization). Syrian Standard 3605/2011 Maximum limits for residues of veterinary drugs in animal products
19. Sniegoski T, Posyniak A, Zmudzki J. Determination of Thiamphenicol and Florfenicol in the chicken kidneys and liver by liquid chromatography-mass spectrometry. Bul Vet Inst Pulawy 2011 vol. 55, 749-753
20. Soliman A. Pharmacokinetics and tissue residue of Toltrazuril in broiler chickens International J of Basic and Applied Sciences July 2015. 4(3):310·
21. Vandenberge V, Delezie E, Huyghebaert G, Delahaut P, Daeseleire E. Residues of Sulfadiazine and Doxycycline in broiler liver and muscle tissue due to cross contamination of feed. Food Addit Contam Part A 2012, 29, 180–188
22. Veerapandian S, Ghadevaru S, Jayaramachandran R. Effect of Enrofloxacin on zootechnical performance, behavior and immunohistopathological response in broiler chicken. 2013 Chennai-600 051, Tamil Nadu, India. doi:10.5455/vetworld. 2013.337-342 .
23. Wareham DW, Wilson P. Chloramphenicol in the 21st century. Hosp Med 2002;63:157-161.
24. Weaver D, Meijerhof R. The effect of different levels of relative humidity and air movement on litter conditions, ammonia levels, growth, and carcass quality for broiler chickens. Poultry Science, 1991. 70, 746–755.
25. White DG, Hudson C, Maurer G. Characterization of Chloramphenicol and Florfenicol Resistance in Escherichia coli Associated with Bovine Diarrhea. J of clinical microbiology, 2000 p. 4593–4598 Vol. 38, American Society for Microbiology.
26. WHO (World Health Organization) 2015. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015. World Health Organization; Geneva, Switzerland.
27. Wijayanti AD, Rosetyadewi AW. The Comparison of Doxycycline Residue in the Meat of Broiler Chickens Administered in Feed and Water. Indonesia media Peternakan, December 2011, pp. 175-178 EISSN 2087-4634.
28. WOAH (World Organization for Animal Health) 2016. Terrestrial animal health code glossary Accessed Oct 2016.
29. Zhao X, Wang B, Xie K, Liu J, Zhang Y, Wang Y, Wang J. Development and comparison of HPLC-MS/MS and UPLCMS/ MS methods for determining eight Coccidiostats in beef. J Chromatogr 2018. 1087-1088:98-107.
30. Zhaoling J, Lifang Z, Chong Z. SPE–UPLC–UV Method for the Determination of Toltrazuril and its Two Metabolite Residues in Chicken and Porcine Tissues. Chromatographic Chinese Journal of Veterinary Science 2014 Vol. 77, 1705–1712.
31. ZuHao S, Liang QZ, Yun ZL, Ke ZQ, Kai SP. Simultaneous determination of residues of Diclazuril and Toltrazuril in chicken tissues by high performance liquid chromatography. Journal article: Chinese Journal of Veterinary Science 2009 Vol.29 No.1 pp.79-81, 109 ref.9