



University of Tehran

Quick screening of Oxytetracycline (OTC) residue in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet using ELISA assay

Rezvan Mousavi Nadushan^{1*} | Behrouz Hazrati²

1. Corresponding author, Department of Fishery, Faculty of Marine science and Technology, Tehran North Branch, Islamic Azad University Tehran, Tehran, Iran. Email: mousavi.nadushan@gmail.com

2. Department of Food Science & Technology, Faculty of Marine Science and Technology, Tehran North Branch, Islamic Azad University Tehran, Tehran, Iran. Email: behruzazratiii@gmail.com

ARTICLE INFO

Article type:

Research Article

Article History:

Received: 15 September 2024

Revised: 19 October 2024

Accepted: 03 November 2024

Published online: 20 December 2024

Keywords:

Cultured fish,

ELISA,

Oxytetracycline residue,

rainbow trout.

ABSTRACT

Rainbow trout is one of the most popular salmonid fish in the world. Increased market demand for rainbow trout has led to the development of intensive farming and the spread of microbial infections during the rearing period. A group of widely used antibiotics is tetracycline, especially oxytetracycline (OTC). In this research, trout samples were purchased from farms in Polur, Karaj, Damavand (main distribution in Tehran province), Sarab and Sivan-Sufian (consumer market: East Azerbaijan province) and 30 samples from each farm and a total of 300 specimens were screened. The detection limit for OTC in rainbow trout was 0.3 ppb and the antibody cross-reactivity was 100%. All salmon were positive for OTC, the mean OTC residues were below the Maximum Limits (MRLs) in Codex Alimentarius, while the limit for OTC in the European Union is set at 0.1 ppm. Base on these results, the consumption of trout from the farms of East Azarbaijan and Damavand is safe, but the consumption of trout prepared from Karaj and Polur farms (ppb 145-130) is not recommended for sensitive and high-risk people. Finally, OTC use should not increase to remain at an appropriate level in the fisheries industry. As a last point, the presence of high amounts of OTC residues in Karaj and Pleur region indicates that tetracycline is consumed during the entire rearing period of trout culture, along with the daily diet, as well as the withdrawal period for removal, before collecting and sending the fishes to the market is not complied.

Cite this article: Mousavi Nadushan, R., Hazrati, B. (2024). Quick screening of Oxytetracycline (OTC) residue in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet using ELISA assay. *Journal of Fisheries*, 77 (4), 269-280. DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2024.379730.1439>



© The Author(s) **Publisher:** University of Tehran Press.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2024.379730.1439>



دانشگاه تهران

غربالگری سریع باقیمانده اکسی تتراسایکلین (OTC) در فیله ماهی قزل آلابی رنگین کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آزمون الایزا

رضوان موسوی ندوشن^{۱*} | بهروز حضرتی^۲

۱. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: mousavi.nadushan@gmail.com

۲. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: behruzazartatii@gmail.com

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۹/۳۰

کلیدواژه:

باقیمانده اکسی تتراسایکلین،

الایزا،

قزل آلابی رنگین کمان،

ماهی پرورشی.

قزل آلابی رنگین کمان یکی از محبوب‌ترین گونه‌های آزاد ماهیان در جهان است. افزایش بازار تقاضا برای این گونه منجر به توسعه پرورش متراکم، شیوع عفونت‌های میکروبی و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دوره پرورش شده است. یک گروه از آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف تتراسایکلین‌ها به‌ویژه اکسی تتراسایکلین (OTC) است. در این تحقیق نمونه‌های ماهی قزل آلابی از مزارع منطقه پلور، کرج، دماوند (عمده توزیع در استان تهران)، سراب و سیوان-صوفیان (عمده توزیع و بازار مصرف: استان آذربایجان شرقی) خریداری و ۳۰ نمونه از هر مزرعه و در مجموع ۳۰۰ ماهی غربالگری شدند. محدوده تشخیص برای OTC در قزل آلابی رنگین کمان ۰/۳ نانوگرم در گرم و واکنش متقابل با آنتی‌بادی ۱۰۰ درصد به دست آمد. نتایج نشان داد کلیه ماهیان قزل آلابی از نظر OTC مثبت اند، میانگین باقیمانده اکسی تتراسایکلین کمتر از حداکثر حد مجاز (MRLs: ۰/۲ ppb) در Codex Alimentarius بودند. این در حالی است که حد مجاز برای OTC در اتحادیه اروپا ۰/۱ نانوگرم در گرم تعیین شده است. بر این اساس مصرف قزل آلابی از مزارع استان آذربایجان شرقی و دماوند ایمن، اما مصرف قزل آلابی تهیه شده از مزارع کرج و پلور (۱۳۰-۱۴۵ ppb) برای افراد حساس و پرخطر توصیه نمی‌شود. در نهایت، استفاده از OTC نباید افزایش یابد تا همچنان در صنعت آبی‌پروری در سطح مناسب باقی بماند. به‌عنوان آخرین نکته، وجود مقادیر بالای باقیمانده OTC در منطقه کرج و پلور مشخص می‌کند که تتراسایکلین در کل دوره پرورش و همراه با رژیم غذایی روزانه مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین دوره قطع مصرف جهت حذف، قبل از جمع‌آوری و عرضه ماهیان به بازار مصرف رعایت نمی‌شود.

استناد: موسوی ندوشن، رضوان؛ بهروز (۱۴۰۳). غربالگری سریع باقیمانده اکسی تتراسایکلین (OTC) در فیله ماهی قزل آلابی رنگین کمان پرورشی (*Oncorhynchus*

mykiss) با استفاده از آزمون الایزا. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۷۷ (۴)، ۲۶۹-۲۸۰.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2024.379730.1439>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2024.379730.1439>



۱. مقدمه

در حال حاضر برآورد می‌شود که تولید جهانی آبزیان شامل ماهی، سخت‌پوستان، نرم‌تنان و سایر جانوران آبزی بالغ بر ۱۰۰ میلیون تن (۱۸۵/۴ تن) در سال باشد. از سوی دیگر، از سال ۲۰۱۸ بالغ بر ۵۲ درصد از ماهیان و سایر آبزیان مصرفی انسان براساس فعالیت‌های آبزی‌پروری تولید می‌شود بنابراین تولیدات آبزی‌پروری بخش مهمی از سرانه کل پروتئین حیوانی مصرفی توسط جمعیت جهان، با رقم تقریبی ۲۰/۵ کیلوگرم را به‌خود اختصاص داده است (Food and Agriculture Organization, 2024, FAO). این تقاضای رو به رشد برای تولید و مصرف ماهی، سریع‌تر از سایر بخش‌های اصلی تولید مواد غذایی، منجر به توسعه فزاینده آبزی‌پروری گردید و روش‌های کارآمد کشت‌های متراکم که با منافع کلان اقتصادی همراه بود، از طریق سازمان خواربار و کشاورزی (FAO) مورد تأیید و تأکید قرار گرفت (Food and Agriculture Organization, 2018). در سیستم‌های پرورشی متراکم، ماهی‌ها در معرض منابع مختلف استرس قرار می‌گیرند که از آن جمله می‌توان به تراکم بالا و اکسیژن کم اشاره نمود، که منجر به ریسک بالاتر شیوع بیماری می‌شود و در پرورش ماهی قزل‌آلا، این شیوع بیشتر و شدیدتر در نظر گرفته می‌شود (Metian *et al.*, 2019).

آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین (Oxytetracycline, OTC) تنها آنتی‌بیوتیک از گروه تتراسایکلین‌هاست که استفاده از آن توسط سازمان غذا و دارو (F.D.A : Food and Drug Administration) برای پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تأیید و توصیه شده است، و لذا مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در صنعت آبزی‌پروری در سراسر جهان به‌شمار می‌رود (Arnaud and Georges, 2001; Lulijwa *et al.*, 2020). این آنتی‌بیوتیک به‌دلیل وسیع‌الطیف بودن (Jerbi *et al.*, 2011)، ارزان و در دسترس بودن معمولاً به‌عنوان آنتی‌بیوتیک اولیه (Sekkin *et al.*, 2011) به‌همراه سولفونامیدها (Turk and Oguz, 2016)، به‌صورت گسترده در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و به‌منظور درمان انواع عفونت‌ها (Espinosa-Mansilla and de la Peña, 2009) خصوصاً عفونت‌های باکتریایی که به‌صورت سپتی‌سمی مشاهده می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chen and Bowser, 2005). این آنتی‌بیوتیک باید در صورت بروز بیماری‌هایی چون فورونکلوزیس و بیماری دهان قرمز روده‌ای، به‌مدت ۱۵ روز، روزانه ۲۵۰-۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلو وزن بدن مورد استفاده قرار گیرد (Leal *et al.*, 2019). علاوه بر این، در برخی کشورها مصرف اکسی‌تتراسایکلین در دوزهای کمتر از دوزهای درمانی (subtherapeutic) به‌مدت طولانی مجاز است و به‌منظور کنترل بروز و شیوع بیماری‌ها و به‌منظور افزایش رشد ماهی؛ با افزودن به غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Van Boeckel *et al.*, 2015; Mog *et al.*, 2020). این در حالی است که استفاده دراز مدت از اکسی‌تتراسایکلین در تغذیه قزل‌آلا می‌تواند منجر به بروز عوارض هیستوپاتولوژیک، سرکوب سیستم ایمنی، عوارض ژنوتوکسیک و تخریب میکروبیوم روده گردد (Payne *et al.*, 2022). تحقیقات اخیر روی مصرف ۴۴ آنتی‌بیوتیک مختلف با غالبیت مصرف اکسی‌تتراسایکلین در گونه‌های مختلف ماهی در سراسر جهان نشان داده است که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت آبزی‌پروری جهانی می‌تواند باعث کاهش یا افزایش نرخ رشد و بقای ماهی شود. در واقع آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به القاء استرس‌های اکسیداتیو در ماهی گردد، و با تحریک پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و سم‌زدایی موجبات تحریک سیستم‌های فیزیولوژیک را فراهم آورده و در نهایت منجر به اختلال در میکروبیوم (dysbacteriosis, dysbiosis) سیستم گوارش ماهی و سایر آبزیان گردند. این تغییرات، سیستم ایمنی ماهی را به‌خطر می‌اندازد که در نهایت منجر به آسیب سلولی می‌شود. سمیت‌های تولید شده ناشی از مصرف مداوم آنتی‌بیوتیک، گلیکولیز هوازی، لیپوژنز و اکسیداسیون اسیدهای چرب را در ماهی مهار می‌کند، و این در حالی است که با شروع گلوکونئوژنز و گلیکولیز بی‌هوازی، نیاز و مصرف انرژی افزایش و رشد در ماهی کاهش می‌یابد (Payne *et al.*, 2022). از سوی دیگر، استفاده صحیح و اصولی از آنتی‌بیوتیک‌ها در مزارع پرورش آبزیان توسط سازمان‌های بین‌المللی مورد توصیه و تأکید قرار گرفته است، اما استفاده گسترده و نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در امر پرورش موجبات بروز انواع ناهنجاری‌ها را برای انسان و آبزیان فراهم نموده است که از آن جمله می‌توان به آلوده شدن کارگران شاغل در مزارع، در معرض خطر قرار گرفتن سلامت موجودات زنده‌ای که در محیط اطراف این مزارع زندگی می‌کنند و آلوده شدن محیط‌زیست اشاره نمود (Serrano, 2005). مهم‌ترین عارضه مصرف نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها، حضور باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی

در گوشت آبزیان و فرآورده‌های حاصل از آنها است که به دنبال مصرف این مواد غذایی؛ وارد بدن مصرف کننده شده، باعث ایجاد عوارض و اختلالات متعدد از جمله مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، واکنش‌های آلرژیک، اختلالات دستگاه گوارش از جمله مستعد شدن دستگاه گوارش به عفونت‌های سالمونلایی، اختلالات عصبی، آسیب‌های بافتی و سرطان گردد (Seo et al., 2024; Aladekoyi et al., 2024). به همین دلیل استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در محصولات غذایی با منشأ حیوانی، نگرانی‌های عمده‌ای را در کشورهای پیشرفته ایجاد کرده است. در بسیاری از کشورهای اروپایی و آمریکایی از جمله کانادا و نروژ، فقط چند آنتی‌بیوتیک مشخص مورد استفاده قرار می‌گیرد. در اکوسیستم‌های آبی کانادا، آنتی‌بیوتیک‌های تأیید شده و مورد استفاده در استخرهای آبزی پروری، شامل اکسی تتراسایکلین، فلورفنیکل، سولفادیازین و سولفادیمتوکسین اند و در نروژ علاوه بر تتراسایکلین، فلورفنیکل و اکسولینیک اسید استفاده می‌شود (Armstrong et al., 2005). تتراسایکلین و سولفونامید نیز به‌طور گسترده در ایالات متحده و شیلی در استخرهای آبزی پروری برای درمان عفونت ماهی مصرف می‌شود.

نظر به بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و معضلات گسترده ناشی از مصرف باقیمانده‌های آنها؛ سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) اقدام به تأسیس یک کمیسیون غذایی به نام Codex Alimentarius نمودند که این کمیسیون محدوده‌های استاندارد حداکثر میزان غلظت باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی مختلف (MRLs: Antibiotic Maximum Residue Limits) را مشخص نمودند. مطابق قوانین کمیسیون (CODEX) حداکثر میزان باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در عضله و پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان؛ بین ۲۰۰ نانوگرم در گرم و یا ۲۰۰ میکروگرم در کیلوگرم مقرر گردید (Codex Alimentarius, 2021)، اما این آستانه در آمریکا ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم (United States Department of Agriculture, 2021)، در اتحادیه اروپا حداکثر ۱۰۰ نانوگرم در گرم (Commission Regulation (EU), 2010) و توسط کمیته آسیا-اروپا ۱۰ نانوگرم در گرم (BCGlobal, 2020) در نظر گرفته شده است.

با در نظر گرفتن موارد فوق و به‌منظور کنترل باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک در ماهیان مصرفی، ضروری است که دوره دفع و پاکسازی برای هر اندام ماهی، براساس گونه، شرایط آب و هوایی منطقه و اندام مورد مصرف تعیین و در زمان برداشت ماهیان رعایت شود. در بسیاری موارد لازم است که با در نظر گرفتن شرایط و محیط پرورش، دوره کاهش و پاکسازی باقیمانده‌ها طولانی‌تر در نظر گرفته شود تا محدوده‌های کمتر MRL حاصل شود و ریسک مخاطرات انتقال و ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در مصرف‌کنندگان به حداقل برسد. بنابراین طراحی روش‌های سریع، کم‌هزینه و قابل اجرا در محل پرورش جهت اندازه‌گیری باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در آبزیان ضروری به‌نظر می‌رسد. از سوی دیگر، نظر به سطح پایین سرانه مصرف ماهی در ایران پایش و معرفی مراکز تولیدی یا عرضه ماهیان قزل‌آلا با مقادیر اندک باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک، می‌تواند منجر به گرایش، اقبال و اطمینان مثبت به مصرف آبزیان در مقایسه با سایر منابع پروتئینی گردد.

در حال حاضر جهت تعیین کمیت باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک از جمله تتراسایکلین در ماتریس‌های غذایی، روش‌های حساس و تخصصی توسعه یافته است. از مهمترین روش‌ها و تکنولوژی‌هایی که در اکثر مطالعات ردیابی باقیمانده تتراسایکلین‌ها در محصولات شیلاتی، مانند میگو و ماهی، مورد استفاده قرار گرفته است می‌توان به HPLC LC/MS/MS و HPLC-PDA اشاره نمود (Susakate et al., 2019; Liu et al 2013; Alanazi et al., 2021). فناوری‌های کروماتوگرافی مانند HPLC و LC/MS/MS حساسیت بالایی را در تشخیص و تعیین کمیت ارائه می‌دهند، اما این فناوری‌ها اغلب زمان‌بر هستند و نیاز به تکنسین‌های متخصص و تجهیزات گران‌قیمت دارند. از سوی دیگر باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند با استفاده از آزمون‌های ایمنی‌شناسی شناسایی شوند. تشخیص اکسی‌تتراسایکلین با روش ELISA بسیار خاص، دقیق، سریع، استفاده از آن بسیار ساده و حد تشخیص آن بسیار حساس است و امکان تجزیه و تحلیل حجم بالای نمونه‌ها را در مدت زمان کوتاه فراهم می‌آورد. در این راستا، می‌توان به مطالعات Sarwer و همکاران (۲۰۱۷) در زمینه ردیابی کلرآمفیکل در میگو و ماهی اشاره نمود که به اعتبارسنجی تکنیک ELISA و تعیین سطح حساسیت آن پرداختند و دلیل انتخاب این روش را حساسیت، دقت بالا و هزینه اندک آن گزارش نمودند.

در حال حاضر قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به طور گسترده به عنوان یک ماهی پرورشی در بسیاری از کشورهای جهان استفاده می شود. همچنین در ایران سالانه ۱۲۰ تا ۱۲۵ هزار تن ماهی سردابی تولید می شود که حدود ۸ هزار تن به کشورهای منطقه صادر می شود. این میزان تولید ایران را در جایگاه سوم تولید ماهیان سردابی در جهان، پس از شیلی و نروژ، قرار داده است. با این وجود تحقیق در زمینه ردیابی آنتی بیوتیک ها در ایران اندک است. بنابراین با توجه به اینکه اکسی تتراسایکلین کاربرد گسترده ای در صنعت پرورش ماهی قزل آلی رنگین کمان دارد، ردیابی سریع و مستمر باقیمانده های این آنتی بیوتیک در سطح مزارع پرورشی امری ضروری به نظر می رسد. از سوی دیگر، اندازه گیری غلظت باقیمانده آنتی بیوتیک ها به روش الیزای رقابتی، فرآیندی دقیق، کاربردی، سریع، کم هزینه و کم خطر است و در سطح ایران سابقه ای مبنی بر ردیابی و اندازه گیری غلظت باقیمانده آنتی بیوتیک به روش الیزا مشاهده نشده است. لذا هدف از این تحقیق، ردیابی باقیمانده آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین در عضله ماهیان قزل آلی رنگین کمان از قطب های پرورش قزل آلا در منطقه پلور، کرج، دماوند، با فرض ریسک بالا و مزارع استان آذربایجان شرقی با فرض و احتمال ریسک آلودگی کمتر قرار داده شد.

۲. روش شناسی پژوهش

این تحقیق در بازه زمانی سه ماه (تابستان ۱۴۰۰) و با تهیه ۳۰۰ نمونه ماهی قزل آلی رنگین کمان پرورشی از ۱۰ مزرعه پرورش ماهی موجود در پنج منطقه جغرافیایی کشور با هدف ردیابی و اندازه گیری غلظت باقیمانده آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین (OTC) بر اساس تکنیک الیزای رقابتی (Competitive ELISA) در نظر گرفته شد. در این راستا، ۳۰ قطعه ماهی از هر یک از مزارع بزرگ و پرتولید منطقه پلور، کرج، دماوند (عمده توزیع استان تهران)، سراب و سیوان-صوفیان (بازار مصرف: استان آذربایجان شرقی)، با انتخاب دو مزرعه در هر منطقه در زمان برداشت و عرضه به بازار با وزن تقریبی ۲۰±۴۵۰ تا ۵۵۰±۳۰ گرم تهیه گردید.

۲-۱. مناطق مورد مطالعه

۱- مهمترین مزارع با بالاترین سهم عرضه به بازارهای هدف در استان آذربایجان شرقی شامل مزارع مناطق صوفیان و سیوان در محدوده جغرافیایی منطقه آزاد ارس-جلفا، مزارع مناطق طاران و ایده لو در محدوده جغرافیایی اطراف شهرستان سراب.
۲- مهمترین مزارع با بالاترین سهم عرضه به بازارهای هدف در استان تهران، البرز و مازندران شامل مزارع منطقه گیلوند در محدوده جغرافیایی اطراف شهرستان دماوند، گرمدره در محدوده جغرافیایی استان البرز و منطقه پلور در محدوده جغرافیایی جاده هراز.

۲-۲. مناطق مورد مطالعه

ابتدا ماهیان خریداری شده در مزرعه پس از تخلیه شکم و جداسازی پوست، و شستشو به آزمایشگاه منتقل گردیدند. سپس قطعات فیله از ناحیه پشت جداسازی، بسته بندی و در فریزر و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. در زمان اجرای غربالگری، ابتدا نمونه ها از فریزر خارج و به مدت سه ساعت در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند تا به دمای محیط رسیدند. سپس فیله های هر ۳ ماهی (از مجموع ۳۰ ماهی از هر مزرعه) با هم توسط هموژنایزر همگن و در نهایت یک گرم از فیله همگن شده توزین و روند استخراج آغاز گردید. لازم به ذکر است که تمامی نمونه های همگن شده با دو تکرار در تست الیزا مورد آزمایش و خوانش قرار گرفتند.

در مرحله اول اجرای آزمایش؛ به پودر لیوفیلیزه اکسی تتراسایکلین (حاوی ۴۵۰ نانوگرم آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین)، مقدار ۱/۵ میلی لیتر از محلول Standard Diluent افزوده و محلول استوک استاندارد اکسی تتراسایکلین با غلظت ۳۰۰ نانوگرم در گرم تهیه شد. سپس رقت های مختلف اکسی تتراسایکلین جهت ترسیم منحنی استاندارد آماده شد. بدین ترتیب که سریال رقت های ۴/۵، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰/۳۷۵، ۰/۱۵ و صفر (کنترل منفی) نانوگرم در گرم تهیه و جذب آنها در دو طول موج های ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر، توسط دستگاه خوانشگر الیزا ساخت شرکت گارنی ریزپرداز (DA-3200) اندازه گیری و ثبت گردید.

متعاقباً، مراحل غربالگری براساس دستورالعمل مندرج در کیت (Oxytetracycline ELISA Bioo Scientific, Cat. No. 1081, USA) انجام شد. لازم به ذکر است که قبل از آغاز مراحل پایش، چربی‌زدایی توسط هگزان انجام شد و در انتهای مراحل پردازش و مجموعه واکنش‌های معرف‌های آنتی‌بادی-اکسی‌تتراسایکلین، واکنش‌های آنزیم پراکسیداز و سوبسترای تترا متیل بنزیدین، جذب نوری (Absorbance) نمونه‌ها همانند رقت‌های استاندارد در طول موج‌های ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر، توسط دستگاه خوانشگر الایزا اندازه‌گیری و ثبت گردید. در انتها مطابق دستورالعمل کیت؛ غلظت خام خوانده شده در ضرب رقت ۱۰۰ ضرب و غلظت نهایی اکسی‌تتراسایکلین بر حسب واحد نانو گرم در گرم (ng/g) به‌دست آمد.

۲-۳. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این تحقیق نمودارهای مربوط به داده‌ها در نرم‌افزار Excel ترسیم گردید. سپس به‌منظور انجام فرآیند آماری و تجزیه و تحلیل پراکنش داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. همچنین به‌منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین غلظت باقیمانده آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در ماهیان قزل‌آلای پرورش یافته در مزارع هر منطقه جغرافیایی از آزمون T مستقل و جهت مقایسه میانگین باقیمانده‌های اندازه‌گیری شده در مزارع مناطق مورد مطالعه از تجزیه واریانس یک‌طرفه به‌همراه آزمون تعقیبی توکی HSD در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده گردید.

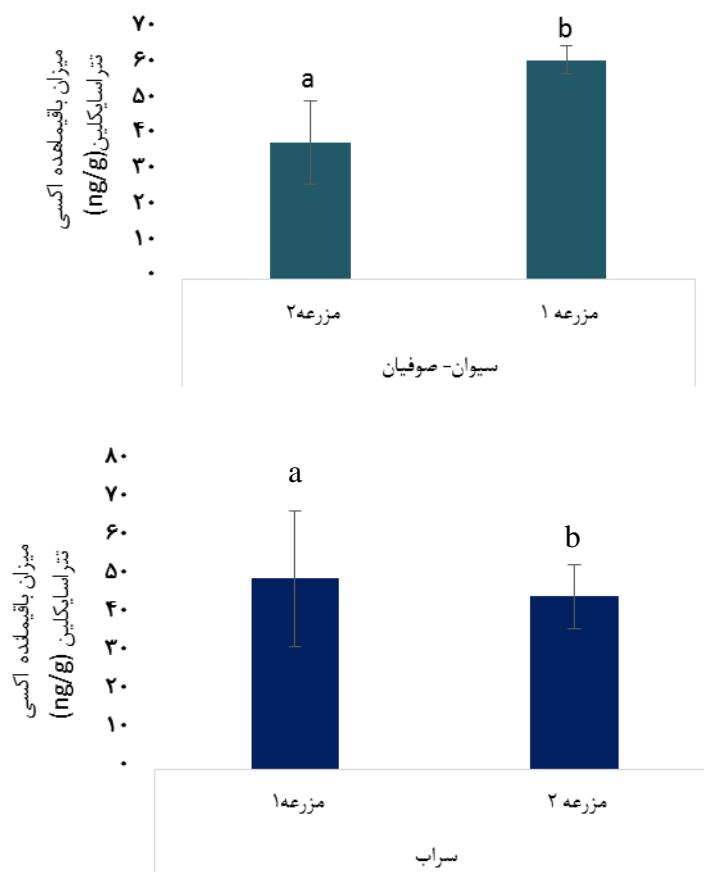
۳. یافته‌های پژوهش

در استفاده از کیت Oxytetracycline ELISA و معرف‌های آنتی‌بادی-اکسی‌تتراسایکلین و واکنش‌های آنزیم پراکسیداز و سوبسترای تترا متیل بنزیدین، رنگ زرد حاصل از واکنش الایزای رقابتی ایجاد، و در نمونه‌هایی که غلظت اکسی‌تتراسایکلین بیشتر بود، شدت رنگ کمتری حاصل شد (شکل ۱).



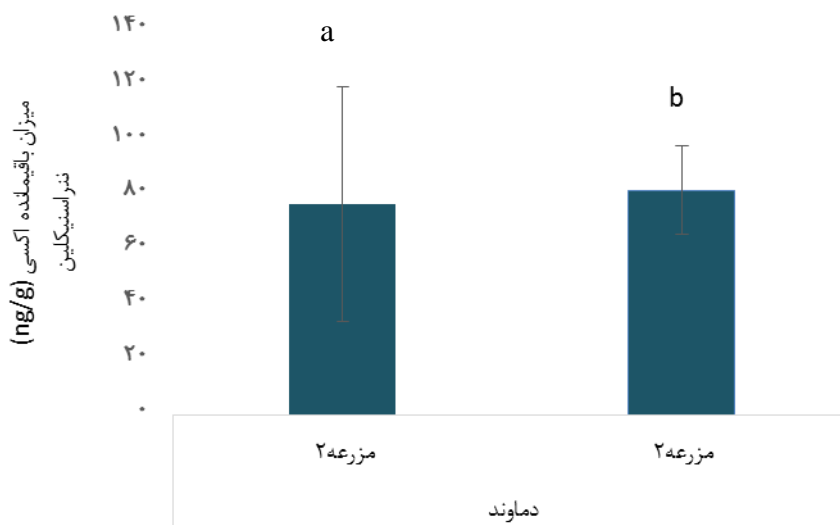
شکل ۱- تصویر آشکار شدن رنگ زرد در آخرین مرحله واکنش‌های آنزیمی در الایزای رقابتی

در پایش باقیمانده آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در ماهیان استان آذربایجان شرقی، کمترین غلظت در نمونه‌های ماهیان مزارع منطقه سیوان به‌میزان $38/3 \pm 8/2$ نانوگرم بر گرم اندازه‌گیری شد (شکل ۲). نتایج آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، نشان داد که توزیع مقادیر باقیمانده‌های اکسی‌تتراسایکلین در ماهیان مزارع استان آذربایجان شرقی پراکنش نرمال دارند ($P > 0/05$). یافته‌های حاصل از آزمون T مستقل اختلاف معنی‌داری را در مقادیر اکسی‌تتراسایکلین اندازه‌گیری شده در ماهیان مزارع منتخب در منطقه سراب نشان داد ($P < 0/05$) و اختلاف باقیمانده‌های اکسی‌تتراسایکلین در ماهیان مزارع منتخب سیوان-صوفیان در سطح اطمینان ۹۹ درصد اندازه‌گیری شد ($P < 0/01$).



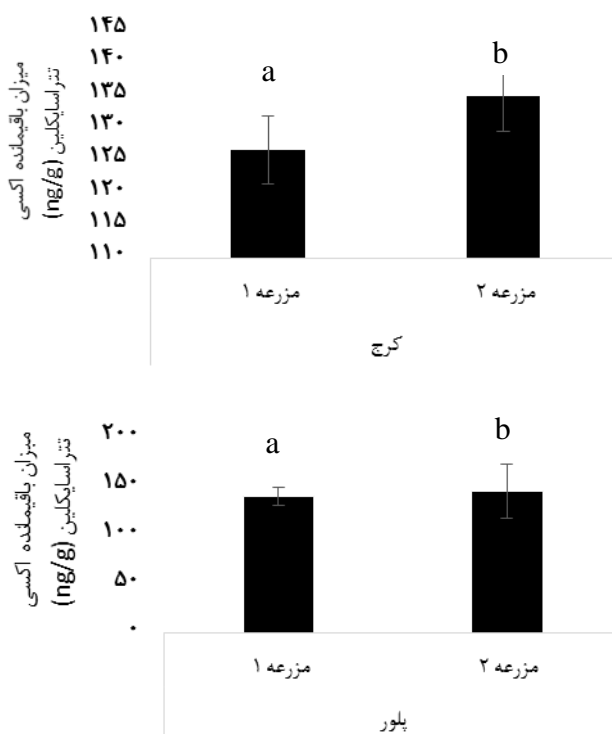
شکل ۲- نمودار میزان باقیمانده اکسی تتراسایکلین اندازه گیری شده در نمونه های مزارع سراب و سیوان- صوفیان، استان آذربایجان شرقی. داده ها براساس میانگین و انحراف معیار ۱۰ نمونه (هر نمونه حاوی فیله هموزن شده از سه ماهی) در دوتکرار (n=20) به دست آمده است و حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است.

میزان باقیمانده های اکسی تتراسایکلین در ماهیان مزارع دماوند حداکثر به مقدار $81/67 \pm 16$ رسید (شکل ۳). نتایج آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، نشان داد که توزیع مقادیر باقیمانده های اکسی تتراسایکلین در ماهیان مزارع دماوند پراکنش نرمال دارند ($P > 0/05$). یافته های حاصل از آزمون T مستقل اختلاف معنی داری را در مقادیر اکسی تتراسایکلین اندازه گیری شده در ماهیان مزارع منتخب در دماوند نشان داد ($P < 0/05$).



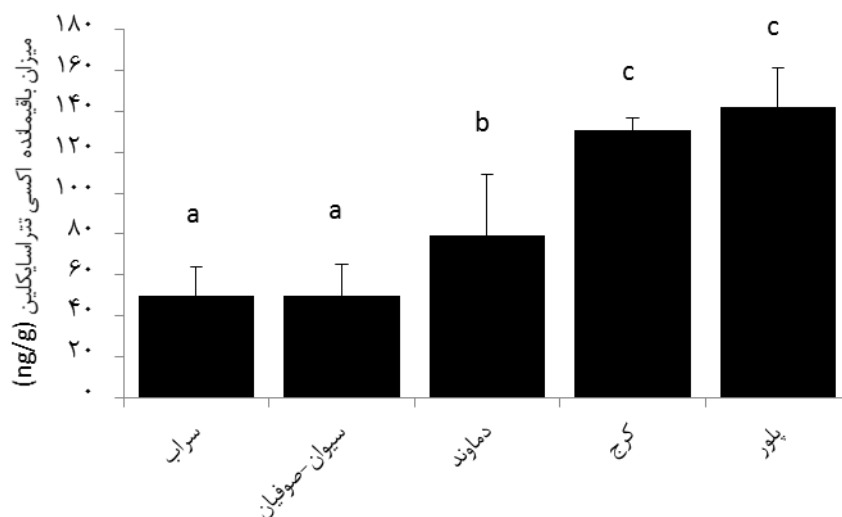
شکل ۳- نمودار میزان باقیمانده اکسی تتراسایکلین اندازه‌گیری شده در نمونه‌های مزارع دماوند. داده‌ها براساس میانگین و انحراف معیار ۱۰ نمونه (هر نمونه حاوی فیله هموژن شده از سه ماهی) در دو تکرار (n=20) به‌دست آمده است و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

در مقایسه میزان باقیمانده اکسی تتراسایکلین در منطقه پلور و کرج بالاترین میزان در محدوده 145 ± 27 نانوگرم بر گرم در ماهیان مزارع پلور ثبت شد (شکل ۳). یافته‌های حاصل از آزمون T مستقل، اختلاف معنی‌داری را میان مقادیر باقیمانده اکسی تتراسایکلین اندازه‌گیری شده در ماهیان مزارع پلور و میان مقادیر اکسی تتراسایکلین اندازه‌گیری شده در ماهیان مزارع کرج نشان داد.



شکل ۴- نمودارهای میزان باقیمانده اکسی تتراسایکلین اندازه‌گیری شده در نمونه‌های مزارع کرج و پلور. داده‌ها براساس میانگین و انحراف معیار ۱۰ نمونه (هر نمونه حاوی فیله هموژن شده از سه ماهی) در دو تکرار (n=20) به‌دست آمده است و حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

در بررسی میانگین باقیمانده‌های اکسی تتراسایکلین به تفکیک منطقه و براساس آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مشخص گردید داده‌ها دارای توزیع نرمال هستند. در مقایسه مقادیر باقیمانده‌های اکسی تتراسایکلین در مناطق جغرافیایی مورد مطالعه بالاترین میانگین در ماهیان مزارع کرج و پلور ثبت شد.



شکل ۵ - نمودار میزان باقیمانده اکسی تتراسایکلین اندازه‌گیری شده در نمونه‌های ماهیان مزارع مناطق جغرافیایی مورد مطالعه

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

تحقیقات در سراسر جهان وجود ارتباطی روشن بین وجود باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در ماهی و نگرانی‌ها درباره خطرات آنها برای سلامت عمومی و محیط‌زیست را نشان داده اند. لذا شناسایی و معرفی مراکز و قطب‌های پرورش قزل آلا که ماهیان دارای سطوح پایین باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک تولید و عرضه می‌کنند، می‌تواند همراه با یک سیاست تشویقی برای پرورش‌دهندگان و افزایش سطح آگاهی مصرف‌کنندگان همراه باشد.

در میان آنتی‌بیوتیک‌ها، اکسی تتراسایکلین (Oxytetracycline, OTC) تنها آنتی‌بیوتیک از گروه تتراسایکلین‌هاست که استفاده از آن توسط سازمان غذا و دارو (F.D.A: Food and Drug Administration) برای پرورش ماهی قزل آلاي رنگین کمان تأیید و توصیه شده است. اما استفاده گسترده و نادرست از آن در مزارع پرورش آبزیان موجب بروز انواع ناهنجاری‌هایی در آبزیان، انسان و آلوده شدن کارگران شاغل و آلوده شدن محیط‌زیست می‌شود (Serrano, 2005). در این پژوهش نتایج بررسی روی میزان باقیمانده اکسی تتراسایکلین اندازه‌گیری شده به روش الیزا نشان داد که تمامی نمونه‌های مورد آزمایش آلوده و میزان اکسی تتراسایکلین در نمونه‌ها در محدوده ۳/۳۸ نانوگرم در گرم در ماهیان مزارع منطقه سیوان-صوفیان و ۱۴۵ نانوگرم در گرم در ماهیان منطقه پلور متغیر بود.

تحقیقات San Martín و همکاران در سال (۲۰۲۱) روی باقیمانده‌های اکسی تتراسایکلین در ماهی قزل آلا و سالمون نروژی (*Salmo salar*) نشان داد براساس آستانه محدوده مجاز مصوب FDA، اکثر ماهیان عرضه شده به بازار قابل مصرف بودند، اما برخلاف انتظار اقشار و مصرف‌کنندگان این ماهیان در کشور شیلی، براساس آستانه مصوب توسط کمیته آسیا-اروپا و حد مجاز ۱۰ نانوگرم در گرم، تمامی ماهیان قزل آلا و آزادماهیان نروژی عرضه شده در بازار مصرف شیلی آلوده محسوب می‌شوند. لازم به ذکر است که کشور شیلی پس از نروژ، بالاترین سهم تولید و صادرات قزل آلا و سالمون را در بازارهای جهانی به‌خود اختصاص داده است (Pandey et al., 2023). قابل توجه اینکه براساس نتایج تحقیق حاضر مقادیر باقیمانده اکسی تتراسایکلین در ماهیان پرورش‌یافته در استان آذربایجان شرقی و منطقه دماوند بالاتر از آستانه مصوب توسط کمیته آسیا-اروپا و حد مجاز ۱۰ نانوگرم در گرم بوده، اما از آستانه مصوب اتحادیه اروپا کمتر است. بنابراین مصرف آنها برای مصرف‌کنندگان حساس و پرخطر، هر چند با احتیاط ولی امکان‌پذیر است. اما ماهیان پرورش‌یافته در مزارع کرج و پلور دارای مقادیر باقیمانده اکسی تتراسایکلین بیش از حد

مجاز ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم، و در عین حال دارای مقادیر کمتر از آستانه مصوب کمیسیون بین‌المللی (CODEX) (کمتر از ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بوده، که مصرف آنها توسط اقشار حساس و پرخطر، توصیه نمی‌شود (Limbu et al., 2021). لازم به ذکر است آستانه‌های اندازه‌گیری شده در ماهیان کرج و پلور نه تنها برای مصرف‌کنندگان، بلکه برای پرورش‌دهندگان نیز هشدار محسوب می‌شود، زیرا در بدو امر و در صورت استفاده مداوم آنتی‌بیوتیک‌ها ابتدا ماهیان و سپس آبزیانی که در معرض پساب‌های مزارع قرار می‌گیرند و در نهایت مصرف‌کنندگان دستخوش مقاومت‌های باکتریایی می‌گردند (Ballash et al., 2022; Xiao et al., 2022).

در تحقیق Mahmoudi و همکاران (۲۰۱۴) در ردیابی باقیمانده‌های تتراسایکلین، کلرآمینیکل و سولفونامید در نمونه‌های قزل‌آلای تهیه شده از فروشگاه‌های شمال شرقی ایران، مشخص گردید که کلیه ماهیان آلوده به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها و ۳۰ درصد آلوده به تتراسایکلین اند، و مقادیر اندازه‌گیری شده در محدوده ۰/۰۹-۲۲/۱۲ نانوگرم در گرم و کمتر از آستانه‌های کدکس بین‌المللی ارزیابی گردید. از سوی دیگر نتایج بررسی Senyuva و همکاران در سال ۲۰۰۰، در ردیابی باقیمانده‌های اکسی‌تتراسایکلین با استفاده از HPLC، نشان داد که ۷۰ درصد از قزل‌آلای فرآوری شده در ترکیه آلوده به مقادیر بالاتر از آستانه‌های مصوب FDA و EU بودند.

یافته‌های حاضر و تحقیقات اخیر نشان داده است که مصرف ماهیان تحت تغذیه و درمان با آنتی‌بیوتیک می‌تواند از طریق تغییر میکروبیوم روده، آسیب به جنین، آلرژی و سرطان‌زایی به‌طور مستقیم سلامت انسان را به‌خطر اندازد (Khalifa et al., 2024). در سال‌های اخیر به‌ویژه مخاطرات سلامتی در کودکان به‌دنبال مصرف ماهیان پرورشی تیلایپا، *Oreochromis niloticus* تیمار شده با اکسی‌تتراسایکلین با مقادیر بالای باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک گزارش گردیده است (Limbu et al., 2021)، جالب توجه اینکه تمامی موارد رسمی گزارش شده از اختلال سلامتی در انسان مربوط به مصرف ماهیانی بوده است که در دوره پرورش آنها آنتی‌بیوتیک به‌صورت افزوده به رژیم غذایی روزانه مورد استفاده قرار گرفته و بازه زمانی قطع مصرف آنتی‌بیوتیک قبل از صید و عرضه به بازار رعایت نشده است (Limbu et al., 2018). با این حال، ریسک سلامت ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها در انسان بستگی به مدت زمان مصرف آنتی‌بیوتیک توسط آبی‌زی دارد. تحقیقات نشان داده است که مصرف ماهی تیلایپای نیل *O. niloticus* تغذیه‌شده با غذای حاوی اکسی‌تتراسایکلین به مدت ۳۵ روز هیچ خطری برای سلامتی انسان ایجاد نمی‌کند (Limbu et al., 2020). آخرین موارد خطر سلامت ناشی از باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک در گزارشها و مطالعات، مربوط به مصرف ماهیانی بوده است که مقادیر بالایی از آنتی‌بیوتیک را از منابع آبی و پساب‌های متعدد جذب نموده‌اند، که از این جمله می‌توان به مصرف ماهیان وحشی آلوده (Ben et al., 2019)، ماهیان پرورش‌یافته در رودخانه‌های آلوده به پساب سایر مزارع (Chen et al., 2018) و استفاده همزمان مصرف‌کننده از آبزیان مختلف شامل میگو، خرچنگ و سایر منابع غذایی آلوده از جمله گوشت قرمز و محصولات لبنی باشد. بنابراین مقادیر بالای باقیمانده‌های اکسی‌تتراسایکلین در ماهیان مزارع کرج و پلور می‌تواند علاوه بر دریافت از طریق غذا، ناشی از آلودگی‌های رودخانه‌های تأمین منبع آب مزارع باشد (Mousavi-Nadushan and Ramezani, 2011; Majdzadeh Tabatabai et al., 2017).

۵. نتیجه‌گیری نهایی

در نهایت به‌نظر می‌رسد در پرورش ماهی و به‌ویژه در مزارع بزرگ و پرتولید که به منابع آبی سالم و عاری از آلودگی دسترسی ندارند، طی دوره پرورش از آنتی‌بیوتیک‌های متنوع و در مقادیر بالا و به‌صورت ممتد استفاده می‌شود. نتایج تحقیقات حاضر نشان می‌دهد که برنامه‌های نظارت بر باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک در ماهی قزل‌آلا باید برای اطمینان مصرف‌کنندگان از ایمنی مصرف آبزیان ادامه یابد. با این حال، پرورش‌دهندگان نیز باید به‌خوبی از اهمیت و مخاطرات بقایای داروها، به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزیان خصوصاً قزل‌آلا برای عموم مردم آگاه شوند. از سوی دیگر، مسئولین شیلات باید پرورش‌دهندگان را در راستای قبول مسئولیت و اجرای شیوه‌های مناسب و ایمن پرورش، یاری‌رسانی و آموزش دهند. در عین حال، روش‌هایی مانند فرآوری حرارتی، کربن فعال، رزین‌ها و تابش UV می‌توانند به غیرفعال کردن بخشی از آنتی‌بیوتیک‌ها کمک کنند. نتایج آخرین تحقیقات

نشان داده است که آب میان‌بافتی جدا شده از فیله‌ها طی فرآیندهای مختلف انجماد و پخت حاوی مقادیر قابل توجهی آنتی‌بیوتیک است بنابراین به مصرف‌کنندگان توصیه می‌شود از مصرف بقایای آب میان‌بافتی اجتناب نمایند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کلیه کارشناسان آزمایشگاه ونوم انستیتو پاستور به‌عمل آورند.

References

- Aladekoyi, O., Siddiqui, S., Hania, P., Hamza, R., Gilbride, K., 2024. Accumulation of antibiotics in the environment: Have appropriate measures been taken to protect Canadian human and ecological health. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 280, 116513. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116513
- Alanazi, F., Almugbel, R., Maher, H.M., Alodaib, F.M., Alzoman, N.Z., 2021. Determination of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline residues in seafood products of Saudi Arabia using high performance liquid chromatography–Photo diode array detection. *Saudi Pharmaceutical Journal* 29(6), 566-575. DOI: 10.1016/j.jsps.2021.04.017
- Alós, J.I., Serrano, M.G., Gómez-Garcés, J.L., Perianes, J., 2005. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in relation to demographic and clinical data. *Clinical Microbiology and Infection* 11(3), 199-203. DOI: 10.1016/j.jcsp.2021.04.017
- Armstrong, S.M., Hargrave, B.T., Haya, K., 2005. Antibiotic use in finfish aquaculture: modes of action, environmental fate, and microbial resistance. *Environmental Effects of Marine Finfish Aquaculture* pp. 341-357.
- Arnaud, N., Georges, J., 2001. Sensitive detection of tetracyclines using europium-sensitized fluorescence with EDTA as co-ligand and cetyltrimethylammonium chloride as surfactant. *Analyst* 126(5), 694-697.
- BCGlobal, 2020. Veterinary Drugs. <https://www.bryantchristie.com/BCGlobal-Subscriptions/Veterinary-Drugs> (accessed 20 November 2020).
- Ballash, G.A., Baesu, A., Lee, S., Mills, M.C., Mollenkopf, D.F., Sullivan, S.M.P., Lee, J., Bayen, S., Wittum, T.E., 2022. Fish as sentinels of antimicrobial resistant bacteria, epidemic carbapenemase genes, and antibiotics in surface water. *Plos one* 17(9), e0272806. DOI: 10.1371/journal.pone.0272806
- Chen, C.Y., Bowser, P.R., 2005. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Nile tilapia *Oreodromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 36(3), 262-270. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2005.tb00330.x
- Codex Alimentarius, 2021. Codex Veterinary Drug Residue in Food Online Database. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/en/> (accessed 17 March 2020).
- Espinosa-Mansilla, A., de la Peña, A.M., 2009. Analysis of antibiotics in fish samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(4), 987-1008. DOI: 10.1007/s00216-009-2872-z
- FAO. 2024. Morocco fisheries statistics: production, consumption and trade. In: FAO Fisheries and Aquaculture Division [online]. Rome, World Wide Web electronic publication. Retrieved on March 2, 2024 from <https://www.fao.org/inaction/globefish/countries/countries/mar/fr/>.
- Jerbi, M.A., Ouanes, Z., Besbes, R., Achour, L., Kacem, A., 2011. Single and combined genotoxic and cytotoxic effects of two xenobiotics widely used in intensive aquaculture. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 724(1-2), 22-27. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.04.010
- Khalifa, H. O., Shikoray, L., Mohamed, M. Y. I., Habib, I., Matsumoto, T., 2024. Veterinary Drug Residues in the Food Chain as an Emerging Public Health Threat: Sources, Analytical Methods, Health Impacts, and Preventive Measures. *Foods* 13(11), 1629. DOI: 10.3390/foods13111629
- Leal, J.F., Santos, E.B., Esteves, V.I., 2019. Oxytetracycline in intensive aquaculture: water quality during and after its administration, environmental fate, toxicity and bacterial resistance. *Reviews in Aquaculture* 11(4), 1176-1194. DOI: 10.1111/raq.12286
- Limbu, S.M., Chen, L.Q., Zhang, M.L., Du, Z.Y., 2021. A global analysis on the systemic effects of antibiotics in cultured fish and their potential human health risk: a review. *Reviews in Aquaculture*. 13 (2): 1015–1059. DOI: 10.1111/raq.12511
- Liu, Y., Yang, H., Yang, S., Hu, Q., Cheng, H., Liu, H., Qiu, Y., 2013. High-performance liquid chromatography using pressurized liquid extraction for the determination of seven tetracyclines in egg, fish and shrimp. *Journal of Chromatography B* 917, 11-17. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.12.036
- Lulijwa, R., Rupia, E.J. and Alfaro, A.C., 2020. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture* 12, 640-663. RAQ, 12344. DOI: 10.1111/raq.12344
- Mahmoudi, R., Gajarbeygi, P., Norian, R., Farhoodi, K., 2014. Chloramphenicol, sulfonamide and tetracycline residues in cultured rainbow trout meat (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*

- 17(2), 147-152.
- Majdzadeh Tabatabai, M.R., Mousavi Nadushan, R., Hashemi, S., 2017. Impact of hydrogeomorphic processes on ecological functions of brown trout habits. *International Journal of Environmental Science and Technology* 14, 1757-1770. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1281-7>
- Metian, M., Troell, M., Christensen, V., Steenbeek, J., Pouil, S., 2020. Mapping diversity of species in global aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 12, 1090-1100. DOI: 10.1111/raq.12374
- Mog, M., Ngasotter, S., Tesia, S., Waikhom, D., Panda, P., Sharma, S., Varshney, S., 2020. Problems of antibiotic resistance associated with oxytetracycline use in aquaculture: A review. *J. Journal of Entomology and Zoology Studies* 8, 1075-1082.
- Mousavi Nadushan, R., Ramezani, M., 2011. Bioassessment of Kordan Stream (Iran) water quality using macrozoobenthos indices. *International Journal of Biology* 3(2), 127-134.
- Pandey, R., Asche, F., Misund, B., Nygaard, R., Adewumi, O.M., Straume, H.M., Zhang, D., 2023. Production growth, company size, and concentration: The case of salmon. *Aquaculture* 577, 739972. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2023.739972
- Payne, C.J., Turnbull, J.F., MacKenzie, S., Crumlish, M., 2022. The effect of oxytetracycline treatment on the gut microbiome community dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) over time. *Aquaculture* 560, 738559. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738559
- Seo, J., Klopogge, F., Smith, A.M., Karu, K., Ciric, L., 2024. Antibiotic Residues in UK Foods: Exploring the Exposure Pathways and Associated Health Risks. *Toxics* 12(3), 174. DOI: 10.3390/toxics12030174
- Sidhu, P.K., Smith, S.A., Mayer, C., Magnin, G., Kuhn, D.D., Jaber-Douraki, M., Coetzee, J.F., 2018. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in tilapia (*Oreochromis* spp.) maintained at three different salinities. *Aquaculture* 495, 675-681. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.044.
- Sekkin, S. and Kum, C., 2011. Antibacterial drugs in fish farms: application and its effects. *Recent Advances in Fish Farms* pp. 217-250.
- Senyuva, H.Z., Özden, T., Sarica, D.Y., 2000. High-performance liquid chromatographic determination of oxytetracycline residue in cured meat products. *Turkish Journal of Chemistry* 24(4), 395-400.
- Serrano, P.H., 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture (Vol. 469). Food & Agriculture Org.
- Susakate, S., Poapolathep, S., Choekjaroenrat, C., Tanhan, P., Hajslova, J., Giorgi, M., Saimek, K., Zhang, Z., Poapolathep, A., 2019. Multiclass analysis of antimicrobial drugs in shrimp muscle by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis* 27(1), 118-134. DOI: 10.1016/j.jfda.2018.06.003
- Türk, E., Oğuz, H., 2016. Investigation of Tetracycline Residues in Fish Caught from Surrounding Fish Farms in Muğla District. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 32(2), 74-79.
- United States Department of Agriculture (USDA), 2021. Maximum Residue Limits (MRL). Database. <https://www.fas.usda.gov/maximum-residue-limits-mrl-database> (accessed 20 November 2020).
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649-5654. DOI: 10.1073/pnas.1503141112
- Xiao, Y., Liu, S., Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, Q., Li, X., 2022. Determination of antibiotic residues in aquaculture products by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Recent trends and developments from 2010 to 2020. *Separations* 9(2), 35. DOI: 10.3390/separations9020035