

SÜT VE ETLERDE BULUNAN BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Ayman ÖNAL (*), Nedret AYDIN (**), Yıldız AYAZ (***),
Demet İŞCAN (****), Niyazi SAVAŞ (*****)

GİRİŞ

Antimikrobiyal kemoterapötik maddeler ve özellikle antibiyotikler, günümüzde birçok alanlarda kullanılmaktadır. Bunların başında tedavi amacı ile kullanım gelmektedir. Ayrıca bir kısım antibiyotikler hayvanlarda et, süt ve yumurta verimini arttırmak ve büyümeyi hızlandırmak amacı ile de kullanılmaktadır. Yemlerine katılarak hayvanlara verilen bu antibiyotiklerin rezidüleri, hayvansal besinlerle halkın tüketimine sunulmaktadır. Bu da halk sağlığı açısından sakıncılar yaratmaktadır. Gerek koruyucu amaçla, gerekse verim artırıcı olarak bu grup ilaçların yem ve sularla, uzun bir süre düşük dozlarda hayvanlara verilmesiyle, çeşitli bakteri türlerinde dirençli suşlar gelişmekte, et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürünlere geçen rezidüleriyle de tehlikeli boyutlarda besin kirlenmesine neden olduğu ortaya çıkmış bulunmaktadır (5, 18, 27, 28).

Halen yıllık antibakteriyel ilaç üretiminin en az % 40 oranında yem katkı maddesi olarak kullanıldığı dünya ortalamalarına göre, kanatlı hayvan yemlerinin hemen tümüne ve diğer hayvanlarına verilen yemlerin de % 60 ma sürekli katıldıkları dikkate alınırsa konunun önemi daha da iyi anlaşılır.

Antibiyotiklerden istenilen anabolizan etkinin sağlanabilmesi için karma yemlere ve içme sularına 25-200 ppm yoğunluklarında katılması gerekmektedir. Ancak bildirilen bu limitler arasında her zaman dengeli bir ayarlama yapılmadığından, antibiyotiklerin olumlu etkilerinin yanısıra, tüketici kesimlerde çeşitli allerjik etkiler, akut ve kronik toksisite riski ile dirençli suşların ortaya çıkması gibi sakıncalarla karşı karşıya kalınmaktadır (5, 12, 31, 13, 32, 6).

(*) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Biyokimya Laboratuvarı, Hzm. Vet.Hek.

(**) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Antibiyotik Laboratuvarı, Uzm. Vet.Hek.

(***) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Gıda Laboratuvarı, Vet.Hek.

(****) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Antibiyotik Laboratuvarı, Vet.Hek.

(****) Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Toksikoloji Laboratuvarı, Vet.Hek.

Bu çok yönlü sakıncalar anlaşıldıktan sonra başta İngiltere, A.B.D. ve Batı Avrupa ülkeleri ile Dünya Sağlık Örgütü (W.H.O) Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (F.A.O) konu üzerinde gereken titizlikle durmuşlardır. İlk kez Swann başkanlığında oluşturulan bir komisyon 1969 da tamamladıkları çalışma raporuyla hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan antibakteriyel ilaçların yarattığı çok yönlü sağlık sakıncalarını, bütün yönleriyle açıklamışlardır (31, 13, 25).

Diğer taraftan, hayvanların özellikle bakteriyel hastalıklarının tedavisinde direkt olarak hasta bireye yönelindiği gibi, bazı hayvanlarda uygulama çoğu kez sürü düzeyinde olmaktadır. Buna en güzel örnek tavuk yetiştiriciliğindeki uygulamalardır (5).

Böylece farklı amaçlarla denetimsiz ve bilinçsiz ilaç kullanımı, beklenilenden daha büyük boyutlarda toplumsal sağlık riski yaratabileceği gibi çok büyük ekonomik kayıplara da yol açabilmektedir.

Swann raporunun sonucu olarak önce İngiltere, A.B.D., Güney Afrika, Avustralya gibi hayvancılığı ve tavukçuluğu ileri ülkeler Oksitetrasiklin, Tetrasiklin (Bütün Tetrasiklin grubu) Furazon grubu, Penisilin Kloramfenikol gibi tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin, yem ilavesi olarak kullanılmasını kanunla yasaklamışlardır.

Konu ülkemiz için de çok önemli olduğundan çeşitli yöntemler denerek et, süt ve yumurta gibi hayvansal besinlerdeki antibiyotiklerin varlığının saptanması amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

LİTERATÜR BİLGİSİ

Penisilin : İlk keşfedilen antibiyotik Penisilindir (Sir Alexander Fleming 1929). En çok *Penicillium notatum* ve *Penicillium chrysogenum* mantarlarından elde edilir (7, 26). Bu güne kadar 40'ı aşkın penisilin türevi elde edilmiştir.

Bütün penisilinler yapılarında β . Laktam halkası taşırlar, genellikle dayanıksızdırlar. Isı, nem, yükseltgeyici maddeler ve bazı enzimler karşısında hızla parçalanırlar (7).

Doğal penisilinlerin etkinliği oxford ünitesi veya Uluslararası Ünite (I.U) ile değerlendirilir. Bir ünite penisilin birimi, 0,6 μ g miktarındaki arı kristal benzil penisilin G-sodyum etkinliğine eşdeğerdir. Yarı sentetik penisilin çeşitlerinin dozu genellikle mg. olarak ifade edilir (29, 26).

Penisilinlerin kandaki düzeyleri 0.03 - 0,05 I.U/ml. olduğu zaman bakteriostatik, 0,5 I.U/ml olduğu zaman bakterisid etki gösterirler (7, 10).

Normal şartlarda penisilin G vücuttan başta idrar ve bir ölçüde de safra ve diğer atılma yollarıyla hızla atılır. Diğer atılma yollarının başında süt gelir. Bu durum hem süt ürünleri imalatını olumsuz yönde etkilemesi hem de penisiline duyarlı kişilerde allerjik tepkimelere yol açması bakımından çok önemlidir. Penisilin verilen hayvanın sütünün 96 saat süreyle tüketim için kullanılmaması tavsiye edilir. Diğer yandan kuru dönemde, doğumdan 60 gün önce meme içi yolla verilen Penisilin G doğumu takiben sütte kalıntı doğurmazken, 30-45 gün önce uygulandığında, doğumu takiben 14 gün süreyle atılabilmektedir (29, 3).

Tetrasiklinler :

Tetrasiklinler, streptomyces türü mantar kültürlerinden elde edilen, geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Yapılarında bir karboksamin grubu ve buna bağlı, 4 fenolik halkadan oluşmuş bir hidronaftasen çekirdiği taşır (7, 26, 29).

Kuru toz halindeki serbest baz hidroklorür tuzları normal ısıda iki yıl etkinliğini kaybetmeden kalabilir. En dayanıksız türevi klortetrasiklin dir. Oksitetrasiklin orta derecede, dimetilklortetrasiklin en dayanıklı bileşikleridir (29).

Tetrasiklinler büyük ölçüde idrarla atılırlar. İkinci derecede safra yoluyla atılırlar. Bu yolla barsaklara gelen tetrasiklinlerin bir kısmı geri emilerek entero-hepatik dolaşıma katılırlar. Bu grup antibiyotikler büyük ölçüde sütle de atılırlar (7, 29).

Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin veteriner, tıp ve hayvan besleme alanında sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir. Japonya'da yapılan bir araştırmada hayvanlar için kullanılan bütün antibiyotiklerin %60 dan fazlasının tetrasiklin olduğu ve mezbahada kesilen hayvanların kas ve organlarında Tetrasiklin grubu antibiyotik kalıntılarına rastlandığı bildirilmiştir (15).

Tetrasiklin grubu antibiyotikler, tedavi dozlarının altında yeme ileve edilecek, optimum sağlığı koruma ve hayvanların gelişmesini artırıcı amaçla kullanılmaktadır (28).

Bütün tetrasiklinler plasentaya geçer ve fetal dolaşıma katılırlar. Böylece önemli ölçüde prostat, eklem ve göz sıvıları ile süt ve yumurtaya da geçerler. Gebelik sırasında uzun süre tetrasiklin verilmesi, fütusta, kemiklerde ve süt dişlerinde renklenme yapmaları yanında gelişme bozukluklarına ve deformasyonlara da neden olabilir (7, 29).

Kloramfenikol :

Kloramfenikol 1947 de Burkholder tarafından Streptomyces venezulae kültürlerinden elde edilmiştir. Diğer antibiyotiklere göre daha basit yapıda olması nedeniyle çok kısa zamanda sentetik olarak hazırlanmıştır. Molekülünde aromatik nitelikli bir nitro ve dikloroasetamid grublarını içerir (7, 29).

Kuru toz halindeki Kloramfenikol, çok dayanıklıdır. Gastrointestinal sistemden çok çabuk absorbe olur ve dokulara hızla yayılır, maksimum kan seviyesine 2-4 saat arasında ulaşır. Dokularda kolaylıkla tahrib olur, idrarla çok az da safra ile atılır. Safra yoluyla bir kısmı barsaklara geldiğinden çok az miktarda feçes ile de atılır. Verilişinden sonra ilk 6 saat içinde büyük bir kısmı idrarla atılır. Aşağı yukarı % 10 u değişmeden atılır, % 80'i conjuğe inaktif metabolitleri halinde atılır (8). Sütle atılma oranı düşük olmakla beraber, bir kez dozun uygulanışından 36 saat sonra bile sütte Kloramfenikol kalıntısı saptanabilir (29).

Kloramfenikol grubu antibiyotiklerin ciddi infeksiyonların dışında kullanılmaması gerektiği bildirilmiştir. Özellikle hafif infeksiyonlarda ve koruyucu-

cu amaçla kullanılması oldukça sakıncalıdır. Netropeni, agranulositozis veya şiddetli vak'alarda aplastik anemi ile birlikte kemik iliği dejenerasyonuna yol açabilmektedir (1, 14, 23).

Hayvansal besinlerde rezidülerin belirlenmesi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılarak konunun aydınlatılmasına çalışılmıştır (11, 17, 21, 22, 23).

Sütte Penisilin ve Penisilin benzeri antibiyotiklerin belirlenmesi için çeşitli mikrobiyolojik metodlar uygulanarak karşılaştırmaları yapılmıştır. Mikrobiyolojik yöntemler genellikle aktif ilacı ölçmekte uygulaması oldukça kolay ve ucuz olmaktadır. Ancak mikrobiyolojik ölçüm sistemlerinin bir dezavantajı, diğer antibiyotiklerle karışabilmesidir.

Süt ve ürünlerindeki penisilin miktarı Com. Reg. (E.E.C) No: 67/92 ye göre 4 µg/kg olmalıdır (9). B. steothermophilus kullanılarak uygulanan disk diffzyon yönteminde (ki en iyi sonuç bununla alınmaktadır) disk plate'lerinin duyarlılığı 0,05-0,08 µg/ml. dir (17). Hayvansal besinlerdeki kalıntıların belirlenmesinde kullanılan kromatografik metodlardan Gaz Kromatografi ile örneğin sütteki ve dokulardaki Kloramfenikol rezidüleri 5 ng/gr. a kadar saptanabilmektedir (23). Bazı araştırmacılar mikrobiyolojik ölçümlerle kloramfenikol rezidülerini sütte 0,025 µg/ml. kas dokularında 0,1 µg/gr. düzeyinde saptanmışlardır (22).

Sütte ve hayvansal dokular daki rezidü limitleri Tablo 1 de gösterilmiştir (9). Tablo I.

İlacın İsmi	Hayvan Çeşitleri	Tolerans limiti	Doku Örneği
Benzil penisilin	Yenebilen bütün hayvanlar	50 µg/kg	Kas, karaciğer,böbrek Yağ
Tetrasiklinler	Yenilebilen bütün hayvanlar	4 µg/kg 600 µg/kg. 300 µg/kg. 200 µg/kg. 100 µg/kg. 100 µg/kg.	Süt Böbrek Karaciğer Yumurta Kas Süt
Kloramfenikol	Yenilebilen bütün hayvanlar	10 µg/kg.	Kas karaciğer, böbrek, yağ

Not : Sütteki kloramfenikol rezidüsü için tolerans limiti (0) olarak kabul edilir.

MATERYAL ve METOD

Süt Örnekleri : Ankara ve çevresinde süt sığırcılığı yapılan kamu ve özel sektöre ait işletmelerdeki sağmal sığırlardan sağlanan çiğ süt ve piyasada satışa sunulan çeşitli kurum ve işyerlerinde sağlanan pastörize süt örnekleri analize alındı.

Intertest Materyali : Süt örneklerinin test edilmesi için Intervet firmasının temsilcisi olan Pabay Maddeler Pazarlama ve Dağıtım A.Ş. den sağlanan Intertest-I ve Intertest-10 setleri kullanıldı (Bu materyalin içinde standardize edilmiş streptococcus thermophilus kültürü ile indikatör bir boya bulunmaktadır).

Diffüzyon yönteminde kullanılan standart suş : Bu amaçla B-Stearothermophilus var. Colidoilactis C 593 suşu liyofilizi olarak Laboratoire de Bacteriologie Laitiere, 78350 Jouy-en Josas, Paris'ten temin edildi.

Kağıt Disklerin Hazırlanışı : Watman No : 2 Filtre kağıtından 3 mm. çapında hazırlanan diskler, sterilize edilerek agar diffüzyon testi için kullanıldı.

I- Intertest Yöntemi :

a) **Süt örneğinin hazırlanması:** Alınan süt örnekleri içindeki doğal inhibitörleri tahrib etmek için süt örnekleri ısı ile muamele edildi. Bu amaçla süt örneğinden ağzı kapaklı deney tüplere 5 ml. konuldu. Kapak gevşetilerek kontrol tüpleri termometre gözlenerek süt kaynama noktasına ulaşıncaya kadar bu suda tutuldu. Süt kaynayınca tüpler alındı, akan su altında soğutuldu kapakları sıkıldı. (Bu şekilde hazırlanan süt örnekleri 24 saat + 4o C de tutulabilir veya hemen işlenir) (16).

b) **Testin Uygulanışı :** Isı ile muamele edilmiş süt örneğinden 2 ml. steril pipetle steril ağzı kapaklı test konuldu. Üzerine 1 adet intertest materyali konuldu ve tüpler 45° C'lık su banyosuna konularak 4 saat inkube edildi.

c) **Sonuçların Değerlendirilmesi :** Su banyosundaki 4 saatlik inkubasyondan sonra süt örneklerinde meydana gelen renk değişimine göre sütlerde antibiyotik veya inhibitör maddeler varlığı değerlendirildi.

Tüplerde mavi renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif, yeşil sarı rengin oluşumu ve pıhtı oluşmaması, şüpheli olarak değerlendirildi.

II- Diffüzyon Yöntemi:

a) **Test Ortamının Hazırlanması :** Trypton agar besiyeri otoklavda steril edildikten sonra 55° C ye kadar soğutuldu. 1 gece önceden aktif hale getirilmiş bakterilerin sıvı kültüründen besi yerine % 20 oranında ilave edilerek

karıştırıldı ve 15 cm. çapındaki petri kutularına bu kültürü içeren besi yeri 9 ml. olarak dağıtıldı.

b) Testin Uygulanışı : Test edilecek ısıyla muamele edilmiş süt örneklerine steril kağıt disk daldırılıp hazırlanan besiyeri üzerine 2 cm. aralıklarla yerleştirildi. Petri kutuları ters çevrilerek $55 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Ayrıca penisilinli süt hazırlanarak bu süte daldırılmış kağıt diskler kontrol olarak kullanıldı.

c) Sonuçların değerlendirilmesi : İnkübasyon sonunda kağıt disklerin etrafında inhibisyon alanı oluşup oluşmaması incelendi. İnkübasyon alanı oluşmuş ise çapı ölçülerek kontrol disk çevresindeki inhibisyon alanı ile karşılaştırıldı. İnkübasyon sonu kontrol sonunda ise test sonucu pozitif olarak değerlendirildi.

III- There Plate Test Yöntemi :

Kasaplık hayvan doku örnekleri : (Sığır eti, sığır karaciğeri, sığır böbreği, tavuk eti ve tavuk karaciğeri) kamu ve özel sektöre ait kesimhane ile piyasa da satışa sunulan çeşitli kurum ve işyerlerinden temin edildi.

Kasaplık hayvan dokularında uygulanan Diffüzyon testinde B. stearothermophilus, B. subtilis ve B. megatherium standart suşları kullanıldı. Bu test suşlarından B. subtilis ile B. megatherium suşlarının sprolarının süspansiyonları elde edildi, B. steorothermophilusun 18 saatlik buyyon kültürü kullanıldı (30).

Three Plate Test Suşlarının Hazırlanması :

a) B. steorothermophilus var. Calidolactis Strain C 953 test suşunun hazırlanması :

Liyofilize haldeki veya stok bakterileri aktif hale getirmek için suş besi yerine ekildi ve 55°C de 1-18 saat inkube edildi (Aktif hale getirilen bakteriler etmaya ekstraktı ile yatık olarak hazırlanan besi yerinde üretildikten sonra buzdolabında saklanabilir).

Test Ortamının Hazırlanması ve Testin Uygulanması : Trypton agar besiyeri otoklavda steril edildikten sonra 55°C kadar soğutuldu. Aktif hale getirilmiş bakterilerin taze sıvı kültürlerinden % 20 oranında besi yerine ilave edilerek karıştırıldı ve besiyeri 55°C ye ısıtılmış petri kutularına 9 ml. olarak dağıtıldı. Vasat katılıştıktan sonra steril koşullarda yaklaşık 1 cm. çapında vasat parçası çıkarıldı ve boşluğa steril koşullarda parçalanan doku örnekleri konuldu.

İnkübasyon sonunda doku örneklerinin etrafındaki inhibisyon alanının çapı ölçüldü ve kontrol disk çevresindeki inhibisyon alanının çapı ile karşılaştırılarak sonuç değerlendirildi.

b) B. subtilis Test Suşunun Hazırlanması ve Testin Uygulanması:

Test suşu olarak B. subtilis ATCC 6633 suşu kullanıldı. Test suşlarının sporlarının süspansiyonlarını elde etmek için oxoid plate Count Agar kullanıldı. Bu vassatta ekilen aktive edilmiş suş 10 gün 30° C de inkube edildi. 10 gün sonunda kültür steril serum fizyolojik ile süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyon 10 dakika 3000 devirde santrifüje edildi. Üst sıvı atılarak, yeniden serum fizyolojik ilave edildi. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Süspansiyon üzerinde kalan mikroorganizmaların ve negatif formlarının tahrib edilmesi için 65° C deki benmaride 30 dakika ısıtıldı. Sonra jerm sayımı yapıldı. Jerm sayımı trypton-tuz solusyonunun onluk sulandırılmaları kullanılarak yapıldı.

Test Ortamının Hazırlanması ve Testin Uygulanması :

Besiyeri olarak Seed Agar kullanıldı. Hazırlanan seed agara B. subtilis suşu (5×10^5 /ml) ilave edildi. Agar üzerinde yaklaşık 1 cm. çapında çıkarılan vasat yerine doku örnekleri kondu. 30° C lik etüvde 18-20 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda petrideki doku parçaları etrafında ki inhibisyon zonları kontrol zonları ile karşılaştırılarak sonuç değerlendirildi. Hazırlanan plaklar aynı gün kullanıldı.

Süt Örneklerinin Test Edilmesi :

Seed agar'a ilave edilen B. subtilis suşu ile teste hazır hale getirilen platele- re ısı muamele edilmiş süt örneklerine batırılan steril diskler vasat üzerine yerleştirildi. Kontrol diskleri de konularak besiyeri inkubasyona bırakıldı. Oluşan inhibisyon zonuna göre sonuç değerlendirildi.

c) B. megatherium Test Suşunun Hazırlanması ve Testin Uygulanması :

Test suşu olarak B. megatherium strain ATCC 9885 kullanıldı. Test suşlarının sporlarının süspansiyonlarını elde etmek için Müller-Hilton agar kullanıldı. Bu agarda 37° C de 16-17 saat inkube edilen suşlar aktive edildi. Bu suşun üreyen kolonileri dilue buffer ile vasata yayıldı. 37° C de 4 gün inkubasyona bırakıldı. Üreyen spor 50 ml. sulandırılmış buffer ile yıkandı ve 3000-5000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldı ve santrifüj 3 kez tekrarlandı. Bu işlem sonunda spor sayımı yapıldı. Trypton-tuz solüsyonu ile spor süspansiyonunun onluk sulandırılması yapıldı. Müller-Hinton agarda 37° C de 48 saat inkubasyon sonucunda jerm sayısı sulandırma katsayısı ile çarpılarak ana solüsyondaki spor sayısı elde edildi.

Test Ortamanın Hazırlanması ve Testin Uygulanması :

Besiyeri olarak Müller Hilton agar kullanıldı. Hazırlanan B. megatherium suşu 5×10^4 /ml. miktarında vasata ilave edildi.

Agar üzerinde yaklaşık 1 cm. çapında çıkarılan vasatın yerine doku örnekleri, orta yere kontrol disk kondu 37° Clik etüvde 5 saat inkube edildikten sonra oluşan inhibisyon zonları ölçüldü ve sonuç değerlendirildi.

Süt Örneklerinin Test Edilmesi :

Müller Hinton agara ilave edilen B. megatherium suşu ile testehazır hale getirilen platelere ısı ile muamele edilmiş süt örneklerine batırılan steril diskler konularak besi yeri inkubasyona bırakıldı. Oluşan inhibisyon zonuna göre sonuç değerlendirildi.

Tetrasiklin'in dokulardan ekstraksiyonu :

- 20 gr. kıyılmış doku örneği alındı, 100 ml. lik santrifüj tüplerine kondu.
- Üzerine 15 ml. 0,022 N HCl ve 15 ml. 0,1 M Na EDTA ilave edilerek homojenize edildi (Birkaç dakika)
- 98° C de 10 dakika su banyosunda ısıtıldı.
- Karıştırıldı ve 10 dakika 2000-3000 devirde santrifüj edildi.
- Boşaltmadan üzerine 2 ml., % 50 Triklorasetik asit ilave edildi.
- Karıştırıldı ve tekrar 10 dakika 98° C de su banyosunda ısıtıldı.
- 10 dakika 2000-3000 devirde santrifüj edildi.
- Buz banyosunda soğutuldu ve süzgeç kağıdından süzüldü.
- Çöküntü atıldı, filtrat üzerine 2 ml. konsantre HCl kondu, karıştırıldı ve 10 dakika 98° C de su banyosunda ısıtıldı.
- Buzda soğutuldu (10 dakika)
- 10 dakika 2000-3000 devirde santrifüj edildi.
- Çöküntü atıldı. Süpernatant üzerine sodyum sitrat ilave edilerek pH 3,5-4,5 a ayarlandı.
- Üzerine 10 ml. Diklormetan kondu ve 5 dakika çalkalandı.
- 10 dakika 2000 devirde santrifüj edildi.
- 5 ml. Diklormetan tabakası alındı azot gazı altında 60° C de kuruyuncuya kadar uçuruldu.
- Rezidüye 0,2 ml. saf Metanol katıldı ve karıştırıldı (2).

İnce-Tabaka Kromatografisi Metodu :

- Silicagel G dökülmüş cam plakalara ekstraksiyondan elde edilen rezidü, tatbik edildi.
- Cam kromatogramlar; m-Butanol+Metanol+ %10 Sitrik asit (57,2 + 14,2 + 28,6) solventinde 40 dakika develope edildi.
- Daha sonra, plakaya; % 5 lik $FeCl_3$ eriyiği (Metanolde) püskürtüldü.

Tetracyclin'ler yeşilimsi kahverengi lekeler haline belirlendi. Rf değerleri çeşitli tetrasiklinler için 0,38-0,46 arasında idi (24).

Kloramfenikol'un dokulardan ekstraksiyonu ve İnce-Tabaka Kromatografisi metodu :

- 10 gr. kıyılmış doku örneği alındı, üzerine 10 ml. Metanol kondu.
- 3000 devirde santrifüj edildi.
- Presipitat atıldı, supernatant 3-4 ml. kalıncaya kadar azot gazı altında 60°C de uçuruldu.
- Süzüldü ve 2x25 ml. Kloroformla ekstrakte edildi.
- Kloroform fazı 60° C de azot gazı altında kuruyuncaya kadar uçuruldu.
- Rezidüye 0,5 ml. metanol ilave edildi ve karıştırıldı.
- Silica-gel G yayılmış cam plakalara, elde edilen rezidü tatbik edildi.
- Cam kromatogramlar;
Kloroform+Metanol+ %10 Amonyak (90+9+1) solvent sisteminde 40 dakika develope edildi.
- Kloramfenikolu belirleme için plakalara Kalay klorür ayırıcı püskürtüldü (10 gr. Kalay klorür, 2 N Sülfürik asitte çözdürülür ve 2 N sülfürik asitle 100 ml. ye tamamlanır).
- 5 dakika kurutulduktan sonra üzerine P, dimetilamino benzaldehit püskürtüldü.
- Kloramfenikol sarı lekeler halinde belirlendi Rf= 0,97 bulundu (19).

Kloramfenikol'un Gaz Kromatografisi için Ekstraksiyon Medotu :

- 5 gr. yarı donmuş doku örneği (kas, karaciğer, böbrek) yuvarlak dipli santrifüj tüplerine kondu (28 mm X 120 mm).
- 2 ml. internal standart ilave edildi (50 mg/ ml).
- Karıştırıldı ve 15 dakika bekletildi.
- 10 ml. etil asetatla iki defa homojenize edildi (10+10=20).
- 700 devirde 5 dakika santrifüj edildi.
- Etil asetat supernatantı konik santrifüj tüplerine alındı ve azot gazı altında 60° C da kuruyuncaya kadar uçuruldu.
- Rezidü 0,2 ml. metanol ve 2,8 ml. 1 N HCl ile eritilerek alındı.
- Bu solusyon 3 kere, 1,5 ml. lik hafif petrolle yıkandı.
- Sep-Pak C18 mini kolon, 2 ml. metanol ve bunu takiben 5 ml. bidistile su ile yıkanarak şartlandırıldı.
- İnternül standart kalınmış bulunan rezidü, şartlandırılan kolondan geçirildi ve atıldı.
- Sonra, Kloramfenikol, 2 kere, 3 ml. metanol ve 1N HCl (40:60) ile elue edildi.
- Eluat, kapaklı santrifüj tüplerine toplandı.
- Metanol fazı, azot gazı altında 60° C de uçuruldu.

- Kalan sulufaz; iki kere 2 ml. etil asetatla ekstrakte edildi.
- Toplanan ekstrakt, temiz konik santrifüj tüplerine konu ve uçuruldu.
- Rezidu 1ml. metanolle yıkanarak tüpten alındı, azot gazı altında metonal uçuruldu.
- Rezidüye 400 Ul. Trisil ilave edildi ve Vortex'de birkaç saniye çalkalandıktan sonra 35° C de 30 dakika bekletildi.
- Trisil uçuktan sonra rezidü, 1 ml. benzenden eritildi ve Gaz Kromatografi cihazına enjekte edildi (20).

BULGULAR

Çalışmamızda toplam 374 adet sığır eti, 429 adet sığır karaciğeri, 365 adet sığır böbreği, 444 adet süt, 158 adet tavuk karaciğeri, 605 adet tavuk örneği olmak üzere toplam 2375 numune diffüzyon ve analitik metotlarla ayrı ayrı işlendi (Tablo 2). 374 adet sığır eti örneği three plate test ile analize alındı. B. sterothrophilus ile çalışılan platelerde 139 (%37.17) adet pozitif, 229 (% 61.23) adedinde negatif sonuç alındı. B. subtilis ile çalışılan platelerde 49 adet (%13.10) pozitif, 322 adet (% 86.10) negatif, B. megatarium ile çalışılan platelerde 11 adet (% 2.94) pozitif, 353 adet (% 94.39) negatif sonuç alındı (Tablo 3).

Tablo : 2

Analizi yapılan örnek	Analizi yapılan örnek sayısı	İNTEKİT			DİFFUZYON METODU									ANALİTİK METOD (T.L.C.)						GAZ KROMA TOGRAFI	
					B. Stearothermophilus			B. megatarium			B. Subtilis			Kloramfenikol			Tetracycline			Kloramfenikol	
		+	±	-	+	±	-	+	±	-	+	±	-	+	±	-	+	±	-	+	-
ET	374				139	6	229	11	10	353	49	3	322	-	-	21	28	-	21	-	-
KARACİĞER	429				53	12	364	13	34	382	52	22	366	7	-	32	51	-	12	-	-
BÖBREK	365	72	65	301	279	9	77	-	4	361	19	1	345	-	-	-	20	-	-	2	-
SÜT	444				39	13	392	14	4	426	24	1	419								
TAVUK KARACİĞER	158				14	2	142	5	1	152	27	2	129	-	-	-	16	-	13	4	-
TAVUK ETİ	605	79			128	1	476	47	-	558	48	-	557	-	-	-	38	-	10	4	-
Örneğin Toplam	2375				152		90			219			17	-		153				4	-

B. subtilis ve B. megatarium ile çalışılan platelerde pozitif sonuç alınan örnekler analitik yöntemle incelemeye alındı. Buna göre three plate testle 11 kloramphenicol olumlu ve şüpheli sonuç veren örnekler TLC ile olumsuz bulundu. Three plate testte 49 adet tetracyclin olumlu ve 3 adet şüpheli örneklerden 28 adeti TLC de olumlu, 21 adeti olumsuz bulundu. TLC metodunun kloramphenicol için duyarlılık sınırı 0.1 µg, tetracyclin için ise 0,1-0,1 µg dır. Aynı metodlarla analize alınan 429 adet sığır karaciğeri örneğinde B. sterothrophilus ile çalışılan platelerde 53 adet (% 12.34) pozitif 364 (% 84.85) negatif sonuç alındı. B. subtilis ile çalışılan platelerde 52 adet (% 12,12) pozitif 366 adet (% 85.31) negatif sonuç alındı. B. megatarium ile çalışılan platelerde 13 adet (% 3.03) pozitif, 382 adet (% 89.64) negatif sonuç alındı (Tablo 4 de).

Tablo 3

Mikroorganizma	Örnek Sayısı	+	+	-
B.stearothermophilus	374	139 %37.17	6 % 1.6	229 % 61.23
B. subtilis	374	49 % 13.10	3 % 0.80	322 % 86.10
B. megatherium	374	10 % 2.67	10 %2.67	353 % 94.39

Tetracyclin ve kloramfenicol olumlu ve şüpheli bulunan örnekler TLC ile analize alındı. Buna göre 7 karaciğer örneğinde kloramphenicol olumlu 38 adedinde olumsuz, 51 örnekte tetracyclin olumlu 12 örnekte olumsuz bulundu. GC cihazının devreye girmesi ile TLC de Kloramphenicol olumlu sonuç veren 7 karaciğer örneğinin dışında 2 karaciğer örneğinde Kloramphenicol sırasıyla 100 ng/gr. ve 120 ng/gr miktarlarında saptandı.

Analize alınan 365 adet sığır böbreği örneğinde There Plate test sonuçlarında, B. sterothermophilus ile çalışılan platelerde 279 adet (% 76, 43) olumlu 77 adedi (% 21, 09) olumsuz, B. subtilis ile çalışılan platelerde 19 adet (% 5,20) olumlu, 345 adedi (% 94.52) olumsuz B. megatariumda çalışılan platelerde 4 adet şüpheli, 361 adedi (% 98.90) olumsuz sonuç alındı.

Tablo 4

Mikroorganizma	Örnek Sayısı	+	±	-
B.stearothermophilus	429	53 % 12.35	12	364 % 84.85
B. subtilis	429	52 % 12.12		366 % 85.31
B. megatherium	429	13 % 3.03	34	382 % 89.04

Analitik yöntemle analize alınan 20 adet böbrek örneğinden 20 adedinde Tetrasiklin olumlu bulundu.

444 adet süt örneği önce İntertest ile incelendi ve 78 adet pozitif (% 17.56), 65 adet şüpheli (%14,63), 301 adet negatif (% 67,79) sonuç alındı. Three

plate test ile analize alınan örneklerden; *B. stearothermophilus* ile çalışılan plate-lerde 39 adet (% 8,78) süt örneği pozitif, 13 adet (% 2,92) şüpheli, 392 adedi (% 88,28) negatif bulundu. *B. megatherium* ile çalışılan plate-lerden 14 adedi (% 3,15) pozitif, 4 adedi (% 0,90) şüpheli, 426 adedi (% 95,94) nega-tif bulundu. *B. subtilis* ile çalışılan plate-lerde, 24 adet (% 5,40) pozitif, 1 adet (% 0,22) şüpheli, 419 adet (% 94,32) negatif sonuç alındı.

Tablo 5

Mikroorganizma	Örnek Sayısı	+	±	-
<i>B.stearothermophilus</i>	365	279 % 76.43	9	77 % 21.09
<i>B. subtilis</i>	365	19 % 5.20	1	345 % 94.52
<i>B. megatherium</i>	365	-	4	361 % 98.90

Tablo : 6

Mikroorganizma	Örnek Sayısı	+	±	-
<i>B.stearothermophilus</i>	444	39 % 8.78	13 2.92	392 % 88.28
<i>B. subtilis</i>	444	24 % 5.40	1 %0.22	419 % 94.32
<i>B. megatherium</i>	444	14 %3.15	4 % 0.90	426 % 95.94
İntertest	444	78 % 17.56	65 % 14.63	310 % 67.79

Three Plate test ile analize alınan 158 adet tavuk karaciğer örneğinde, B. stearothermophilus ile çalışılan platelerde 14 adet (% 8.86) pozitif, 2 adet (% 1,26) şüpheli, 142 adet (% 89, 87) negatif sonuç alındı. B. megatorium ile çalışılan platelerde, 5 adet (% 3,16) pozitif, 1 adet (% 0,63) şüpheli, 152 adet (% 96,20) negatif sonuç alındı. B. subtilis ile çalışılan platelerde 27 adet (% 17,08) pozitif 2 adet (% 1, 26) şüpheli, 129 adet (% 81,64) negatif sonuç alındı. Tablo: 7

Mikroorganizma	Örnek Sayısı	+	±	-
B.stearothermophilus	158	14 % 8.863	2 % 1.26	142 % 89.87
B. subtilis	158	5 % 3. 16	1 % 0.63	152 % 96.20
B. megatherium	158	27 % 17.08	2 % 1.26	129 % 81.64

B. subtilis ile pozitif ve şüpheli bulunan 29 adet tavuk karaciğeri T.L.C. metoduyla analize alındı. 16 adedi pozitif 13 adedi negatif bulundu. B. megatorium ile pozitif ve şüpheli bulunan 6 örnek, Gaz Kromatografi analize alındı 4 ünde Kloramfenikol sırasıyla 85 ng/gr. 125 ng/gr. 100 ng/gr, 120 ng/gr. miktarlarında saptandı.

Three plate test ile analize alınan 605 adet tavuk eti örneğinde; B. stearothermophilus ile çalışılan platelerde, 128 adet (% 21,15) pozitif, 1 adet (% 0,16) şüpheli, 476 adet (% 78,67) negatif sonuç alındı. B. megatorium ile çalışılan platelerde, 47 adet (% 7, 76) pozitif, 558 adet (% 92,23) negatif sonuç alındı. B. subtilis ile çalışılan platelerde, 48 adet (% 7, 93) pozitif, 557 adet (% 92, 06) negatif sonuç alındı. Tablo 8.

B. megatorium ile olumlu bulunan 47 örnekten 4 ünde Gaz Kromatografi cihazı ile sırasıyla 80 ng/ gr., 10 ng/gr. 120 ng/gr., 90 ng/gr. miktarlarında Kloramfenikol saptandı.

T.L.C. yöntemiyle olumlu bulunan örneklerin hepsi de semikanti tarif olarak 0,5 µg / gr. in üstünde bulundu.

Çalışmamızın başında bu analizlerin yumurtalar üzerinde de yapılacağı belirtilmişti halde, aynı işlemlerin bir de yumurtalarda tekrarlanması mümkün olmadı. Fakat ayrı bir araştırma olarak yapılması gerektiğine inanmaktayız.

Mikroorganizma	Örnek Sayısı	+	±	-
B.stearotherophilus	605	128 % 21.15	1 % 0.16	476 % 78.67
B. megatherium	605	47 % 7.76	-	558 % 92.23
B. subtilis	605	48 % 7.93	-	557 % 92.06

Tablo: 8

TARTIŞMA

Çalışmamız sonucunda toplam 2375 örnek analiz edildi. (374 sığır eti, 429 sığır karaciğeri, 365 sığır böbreği, 444 süt, 158 tavuk karaciğeri, 605 tavuk eti olmak üzere).

Bunlardan Diffüzyon yöntemiyle, 652 örnekte Penisilin, 90 örnekte Kloramfenikol, 219 örnekte Tetrasiklin saptandığı halde, Analitik yöntemlerle 17 örnekte Kloramfenikol, 153 örnekte Tetrasiklin saptanabilmesi, kanımızca çeşitli nedenlerden ileri geldi. Bunların başında; Diffüzyon yönteminde her ne kadar, B. subtilis suşu, Tetrasiklinler için, B. megatorium suşu, Kloramfenikol için, B. sterotherophilus suşu da Penisilinler için en duyarlı suş olmakla beraber bu duyarlılık % 100 olmadığından diğer antibiyotikler karşısında da zon verebilmektedir. Aslında, ele alınan her örnek, kullanılan yöntemde, üç suşla da ayrı ayrı incelendiğinden, aynı örnek, her üç suşla da veya iki suşla da zon vermektedir. Bu bakımdan da Diffüzyon yöntemindeki pozitiflerin sayısı artmaktadır.

Ayrıca azmiktarda antibiyotik içeren örnekler, ekstraksiyondaki kayıplar nedeni ile de saptanamış olabilir.

Fakat her ne sebeble olursa olsun, Tetrasiklin veya Kloramfenikol değilse de başka bir antibiyotiğin varlığını göstermesi bakımından, bu çalışmada bulunan pozitif sonuçlar, küçümsenemeyecek boyutta bulundu. Aydın ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Ankara piyasasından toplanan pastörize ve çiğ süt örneklerinde, İntertest ve Diffüzyon yöntemleriyle çalışılmıştır. Toplam 307 örnekten, pastörize sütlerde intertest ile % 29, çiğ sütlerde % 14,5 çiğ sütlerde % 15,7 pozitif sonuç alınmıştır. (4).

Ülkemizde, daha önce bir çok recovery çalışması yapıldığı halde etlerde, bu şekilde bir rezidü, çalışması henüz sonuçlanmadığından, bulgularımızı karşılaştırma olanağı bulunamadı. Avrupa ülkelerinde ise bu tip çalışmalar 1960 öncesine dayandığından ve Swann raporundan sonra antibiyotiklerin yemlere katılması yasaklandığından, kontrol çalışmaları yapıldığı halde

araştırma çalışması bulunamadı.

Ülkemizde de bu tip antibiyotiklerin bilinçsizce yemlere katılmasının önlenmesi, çok zararlı olanların beslenmede kullanılmasının yasaklanması, tedavideki hayvanların belli bir süre, ürünlerinin insan tüketimine sunulmasının önlenmesi gerektiği kanısına varıldı.

ÖZET

Bu çalışmada çeşitli yöntemler denenerek et ve süt gibi hayvansal besinlerdeki antibiyotiklerin varlığının saptanması amacıyla yapıldı.

Sütlerde önce İntertest sonra Three Plate Test uygulandı.

Et, karaciğer ve böbrek örnekleri önce Three Plate test ile incelemeye alındı. Burada Tetrasiklin yönünden pozitif çıkan örnekler, T.L.C. yöntemiyle, Kloramfenikol yönünden pozitif ve şüpheli bulunan örnekler Gaz Kromatografi ile incelenmiştir.

Toplam 2375 örnek (374 adet et, 429 adet karaciğer, 365 adet böbrek, 444 adet süt, 158 adet tavuk karaciğeri ve 605 adet tavuk eti olmak üzere) analiz edildi.

Sonuçta İntertest yöntemiyle 78 örnek, Diffüzyon yöntemiyle ;

Penisilin yönünden 652 örnek, Kloramfenikol yönünden 90 örnek, Tetrasiklin yönünden 219 örnek, Analitik yöntemlerle de; Kloramfenikol yönünden 17 örnek, Tetrasiklin yönünden 153 örnek pozitif bulundu.

SUMMARY

This study were carried out to determine the antibiotic residues in milk and meat form food-producing animal.

First the intertest method and than the Three Plates Test were applied to milk samples. The samples of meat, liver and kindey were inspected with Three Plates test. The specimens which gave positive results for Tetracycline were analysed by T.L.C. method, the specimens which were found to be positive and suspicious for Chloramphenicol were inspected by the application of Gas Chromatographic.

Totally 2375 samples (consisted of 374 meat, 429 livers, 365 kidneys, 444 milk samples, 158 chicken livers, 605 chicken meat) were analysed.

As a result, 78 samples were found positive by Intertest method. By using the Diffusion method, 652 samples, 90 samples and 218 were found positive for Penicillin, Chloranphenicol and Tetracycline respectively. By the analytical technique, 17 and 153 samples were found positive for Chloramphenicol and Tetracycline respectively.

LİTERATÜR LİSTESİ

- 1- ALLEN, E.H. (1985) : Rewiev of chromatographic Methods for Cloramphanecol residues in milk, eggs and tissues form food-producing animals. J.Assoc off Anal. Chem. Vol. 68. No: 5
- 2- ASHWROTH, R.B. (1985) : Liquid chromatographic assay of Tetracyclines in tissues of food Producing animals. J. Assoc.off.Anal.Chem. Vol. 68 No: 5.
- 3- AUSTIN, R. (1990) : Method for the isolation and liquid chromatographec de termination of Chramphenicol in milk. J. Agric.Food.Chem. 38, 427-429.
- 4- AYDIN, N., CAMBAZOĞLU, AYHAN, H. (1989) : İntertest yöntemiyle, sütteki antibiyotiklerin ve diğer inhibitör maddelerin saptanması üzerinde çalışmalar. Etlik Vet. Mikrobiyoloji Dergisi Sayı : 5, Cilt : 6.
- 5- AYDIN, N., İSTANBULLUOĞLU, E., AYDIN, N. (1984) : Yemlere katılan çeşitli antibiyotiklerin, civciv ve piliçlerin barsak florasındaki koliform grubu bakterilerin direnç durumları üzerine etkisi. Doğa-Bilim Dergisi Seri: D1, Cilt: 8 Sayı: 1, 5-16.
- 6- AYDIN, N. (1978) : Plazmidler, epizomlar ve bunların kalıtsal olarak antimikrobiyel ajanlara direçlilikteki rolleri. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi Temmuz-Aralık, Cilt: 84, Sayı: 3-4, 6-15.
- 7- BRANDER, G.C., and PUGH, D.M. (1971) : " VETERINARY Applied Pharmacology and Th rapeutics." Second Edition-Published in the U.S.A. by The Williams and Wilkins company, Baltimore 309-363. Printed in Great Britain at the University Press Aberden X+515.
- 8- CLARKE, E.G.C. (1969) : " Isolation and Identification of Drug" The Pharmaceutical Press 17 Bloomsbury Square WCI London 246, XXI+870.
- 9- COMMISSION REGALATION (E.E.C) (1992) : Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medical product in food-stuffs of animal origin. Official Journal of te European Communities.
- 10- ÇALANGU, S. (1988) : Antibiyotiklerin sınıflandırılması. Literatür / Antibiyotik 1 6-8.
- 11- DIETER, A., SMOGYI, A. (1985) : Thace analysis of Chloramphenicol residues in eggs, milk and meat : Comprarison of gas chromatography and radiomimuassay. J. Assoc. off Anal. Chem. Vol. 68, Nr. 68, Nr. 5.

- 12- F.A.O Food ad Nutrition Paper (1979) : Manuals of food quality control 3. commodities 14/ 3.
- 13- F.A.O O.M.S (1969) Normel didentite et de divers antibiotiques. Rennion de la F.A.O. sur Nutridion Rapport No: 45. A.O.M.S Additifs Alimentaires 167. 34.
- 14- GARY, O. (1987) : A comparison of three biasssay techiques for the detection of Chloramphenicol residues in animal tissues. I. Agric. Food. Chem. 35. 556-559.
- 15- GEORGE, S.F. (1983) : drug residues in animal tissues. J. Assoc. off. Anal. Chem. Vol. 66, No. 6.
- 16- Intertest Method : Intervet International B.V. Boxmeer-Holland.
- 17- Lacarte Test Chloramphenicol : TA 72009 Üransia GmbH industriediagnostica.
- 18- MİNBAŞ, A., ERDİNÇ, H., BERKER, A. (1989) : Hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımının insan sağlığına etkisi. U.Ü.Vet.Fak.Derg. 1-2-3, 151. U.Ü. Basımevi.
- 19- NIIDERT, E., SASHENBRECKER, P., TITTIGER, F. (1987) : T.L.C./ Bioacetographic determination of antibiotic residues in animal tissues. J. Assoc. off. Anal. Chem. Vol.70, No.2, 197-200.
- 20- NOUWS, J.R., COPELAND, K.F.T., FORSTER, R.J., CAMPBELL, D.J. and BLACK, W.D. (1983) : Biomedical applications. Journal of Chromatography 276., 438-44.
- 21- NOUWS, J.F.M. (1979) : Distbution and residues of macrolide antibiotics in normal dairy cows. Archiv für Lebensmittelhygiene Nowember / Dezember. 30, 202-208.
- 22- NOUWS, W.F.M. (1988) : Monitoring milk for Chloramphenicol rasidues by an immunoassay (Quick-Card) The Veterinary Quarterly Vol : 10, No: 4.
- 23- SCHWARZER, C. (1986) : Pattern of Chloramphenicol Levels in the udder secretions of cows after intramamary administration of tordomyocel-L. suspension at drying off. Veterinary Medical Review 1., 50-54.
- 24- STAHL, E. (1969) : Thin Layer Chromattography A Laboratory Hand Book" Spiringer-Verlag Berlin-Heidelberg NewYork. 573-574, XXIV+1041.
- 25- SWANN, M.M.J. (1969) : Joint Commite on the use of antibiotics in animal husbandry an Veterinary Medicine, Her Majesty's sationary office, London, 1-60.
- 26- ŞANLI, Y. (1983) : "Veteriner Farmokolojisi Kemoterapötik İlaçlar." A.Ü. Veteriner Fakültesi Teksir. 83-84. 13.

27- ŞANLI, Y. (1984) : Besinlerimizdeki antibiyotik artıkları, Bilim ve Teknik 2: 29-31.

28- ŞANLI, Y., AYDIN, N., İZGÜR, M., AKMAN, A., BAYDAN, E. (1987) : Sağıtıcı bazı antibiyotiklerin hayvan yetiştiriciliğinde verim artırıcı ve koruyucu amaçlarla kullanılması sonucu, bakterilerde gelişen, direnç kazanma olgusunun invivo ve in vitro olarak mikroorganizmalarla araştırılması. Doğa, TU Vet. ve Hay. D.C. 11 5 1.

29- ŞANLI, Y., KAYA, S. (1991) : Veteriner Farmakolojisi ve İlaçla Sağıtım Seçenekleri" 1. Baskı. Medisan Yayınları. 4, 553-603.. Feryal Matbacılık San. ve Tic. Ltd. Şti. X+790.

30- THREE-PLATE TEST (1987) : Bulletin of the International Dairy Federation 220. 43-51.

31- W.H.O., 1969 : Specification for the identity and Purity of food additives and their toxicological evaluation ; some antibiotics WHO. Teah. Rep. Ser., 430.

32- W.H.O., 1974 : Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and specification. W.H.O. Tech. Rep., Ser. 539.