

KLORAMFENİKOL, PENİSİLİN VE TETRASİLİN GİBİ MASTİTİS SAĞALTIMINDA KULLANILAN ANTİBİYOTİKLERİN SÜTTEN ATILMA SÜRELERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

The studies on persistency in milk of some antibiotics such as Cloramphenicol, Penicilline and Tetracycline used in mastitis therapy

Nedret AYDIN* Yıldız AYZ * Fatma UYANIK *
Demet İŞCAN * Hürriyet BÜLBÜL*

ÖZET

Bu çalışmada Kloramfenikol, Penisilin ve Tetrasiklin gibi mastitis sağaltımında kullanılan antibiyotiklerin süttten atılma sürelerinin saptanmasında Intertest, Three Plate Diffüzyon Ve Biyootografi yöntemi, Gaz Kromotografi ve Likit Kromotografi yöntemleri kullanılmıştır. CMT uygulanarak ineklerden alınan süt örneklerinde fossomatikle yapılan somatik hücre sayımları sonucunda saptanan 500.000'in üzerinde somatik hücre bulunan örneklerden bakteriyolojik muayeneler yapılmıştır. Bakteriyolojik muayene sonucunda Staph. aureus , Staph. epidermidis , Str. aglactiae , Str. uberis , Str. faecalis, Corynebacterium spp., E. coli, Bacillus spp. Pseudomonas spp. izole ve identifiye edilerek bu etkenlere karşı antibiyotik duyarlılık testi uygulanmıştır. Antibiyogram sonucuna göre Kloramfenikol, Penisilin ve Tetrasikline duyarlı olduğu belirlenen hayvanlar ayrılarak 3 gün süre ile antibiyotiklere intramusküler ve intramamamal yolla sağaltıma alınmışlardır. Sağaltımı takiben 4 gün süre ile belirli aralıklarla yapılan sağaltımlarda alınan süt örnekleri Intertest, Three Plate Diffüzyon, Biyootografi Gaz ve Likit kormotografi yöntemleri ile incelenmişlerdir. Sonuçta Intertest ve Diffüzyon yönteminin uygulanması kolay ve pratik yöntem oldukları anlaşılmış olup 4. gün dahi bu yöntemlere göre sağaltımında antibiyotiklerin ve özellikle, penisilin atıldığı ortaya konulmuştur. Biyootografik yöntemle de benzer sonuçlar alınmıştır. Gaz ve Likit kromotografi yöntemlerinde ise kantitatif olarak genellikle diffüzyonda son zon verenden bir önceki ve iki sonraki süt örneklerinde antibiyotiklerin varlığı tespit edilmiştir.

* Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü - ANKARA

SUMMARY

In this study, the persistency of some antibiotics used for curing mastitis such as Chloramphenicol, Penicilin and Tetracycline were determined in milk by using Intertest, Three Plate Test and Bioautographic, Gas Chromatographic and Liquid Chromatographic methods. Somatic cell counts were determined by fossomatic cell counter on the milk samples found postive with CMT and bateriological examinations erformed on tehe milk samples wiht over 500.000 somatic cell counts. With the bacteriological examinations Staph aureus, Staph. epidermidis, Str. agalactiae, Str.uberis, Str.faecalis, Coryne bacterium spp., E.coli, Bacillus spp. and Pseudomonas spp. were isolated and idenfied and antibiotic sensitivity test were performed. The sensitive animals to Chloramfenicol, Penicilin and Tetracycline were separeted and treated for three days with these antibiotics by intramuscular and intramammal route. During the four days following the treatment samples were taken with certain intervals and inetrtest, Three Plate Test and Bioautographic, Gas Chromatographic and Liquid Chromatographic analysis were carried out. It was foud that Three Plete Testand Intertest methods were easy and pratical and with these methods antibiotics used in the treatment, especially penicilin, found in milk samples even in the fourth day. Similar reults were obtanied with the bioautographic method. In the samples that gave the last zones, and also the samples before and after the last zones with diffusion test, antibiotic residues detected quantitatively with gas chromatograpy and liiquid cahromatography.

GİRİŞ

Genel olarak bütün memeli hayvanlarda görülen meme dokusunun yangısı olan mastitis süt veriminin azalmasının yanısıra sütün fiziksel, kimyasal ve özellikle bakteriyolojik değişikliklere meme dokusundaki değişiklikler ile karakterize bir hastalıktır. Memenin kısmen veya tamamen tahrip olmasına, hatta bazen hayvanın ölümüne de neden olabilir. Mastitis infeksiyöz olmayan nedenlere bağlı olarak da ortaya çıkmaktadır. İnfeksiyöz etkenler arasında; Staph.aureus, Staph.epidemidis, Str. agalactiae, Str. dysgalactiae, Str. uberis,

Micrococcus spp., E. coli, C. pyogenes, C. bovis, C. ulserans, Ps. aeruginosa, S.marcescens, P.multocida, P.heamolytica, Bacillus spp., Brucella spp., Cl.perfringens v.b. etkenler sayılabilir. İfeksiyöz olmayan mastitisler ise toksit ve traomatik nedenlere bağlı olarak gelişir. Hastalığın ortaya çıkışında kalıtım , yaş, beslenme, yüksek süt verimi, hatalı sağım, anatomik kusurlar, memelerdeki yaralanmalar, pis ahırlar, insekler gibi faktörler de yardımcı nedenler arasındadır. (3,5,33)

Hastalıktan korunmada; hijyenik önlemler yanısıra klinik mastitislerin vakit kaybedilmeden sağaltımı, subklinik mastitislerin zamanında tesbiti ve hayvanların kuruda iken sağaltılması esas alınmaktadır. Sistematik kontrol programı çerçevesinde klinik mastitisli hayvanlardan alınan süt örneklerinden etken izalasyonu ve identifikasyonları ile antibiyogram uygulamalarına dayanan sağaltım uygulamaları oldukça başarılı olmaktadır. Mastitis sağaltımında gerek meme içi, gerekse parenteral olarak uygulanan çok çeşitli preparatlar bulunmaktadır. Rastgele ilaçlarla yapılan sağaltım halen rastlanılan uygulamalar arasında olup bu tür uygulamalar sonucunda çeşitli antibiyotiklere karşı dirençli bakteri suşları olduğu gibi et-süt ve süt ürünleri de büyük boyutlarda kirlenmektedir. (3,16)

Antimikrobiyal kematerapötik maddeler ve özellikle antibiyotikler günümüzde birçok alanlarda kullanılmaktadır. Bunların başında sağaltım amacıyla kullanım yer almaktadır. ayrıca bir kısım antibiyotikler hayvanlarda et, süt ve yumurta verimini arttırmak ve büyümeyi hızlandırmak amacıyla da kullanılmaktadır. Özellikle, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde evcil hayvanların %80'i yaşamları boyunca, en azından yaşamının bir kısmında ilaç uygulamasına maruz bırakılmaktadır. İlaçların elimasyon süresi bitmeden, hayvansal ürünlerin et, süt, yumurta şeklinde tüketime sunulmasıyla besinlerde kimyasal kirliliğe yol açmaktadır. Bu da halk sağlığı açısından sakıncalar yaratmaktadır. Gerek koruyucu amaçla, gerekse verim artırıcı olarak ilaçların yem ve sularla uzun bir süre düşük dozlarda hayvanlara verilmesiyle de çeşitli bakteri türlerinde dirençlilik olgusu geliştiği gibi et, süt ve yumurta gib hayvansal ürünlere geçen rezidüleriyle de tehlikeli boyutlara ulaşan besin kirlenmesinin ortaya çıkışı yapılan sayısız araştırmalarla saptanmış bulunmaktadır. (4,16,20,30,32)

Antibiyotiklerden istenilen anabolizan etkisinin sağlanabilmesi için karma yemlere ve içme sularına 25-200 ppm yoğunluklarında katılmaları

gerekmektedir. Ancak bildirilen bu limitler arasında her zaman dengeli bir ayarlama yapılmadığından antibiyotiklerin olumlu etkileri yanısıra olumsuz etkileri de görülmektedir. Bu antibakteriyel ajanlar, diğer taraftan başta meme içi uygulamalar olmak üzere oral ve parentenal yollarla kullanıldığında sütle atılabilmekte ve tüketici tarafından düşük dozlarda alınan antibiyotik kalıntıları, basit yan etkilerinden, öldürücü reaksiyonlara kadar gidebilen sakıncaları da beraberinde getirmektedir. Penisilin, Kloramfenikol, Sefalosporinler, Streptomisin, Novobiosin, Oleandomisin ve Tetrasiklinler insanlarda erken veya geç oluşan aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olabilmektedir. (11,12,13,17)

Antibiyotik kalıntılarının insan sağlığı üzerinde sakıncaları anlaşıldıktan sonra bazı Batı Avrupa Ülkeleri ile Dünya Sağlık Örgütü ve Dünya Gıda Tarım örgütü 1969'da Swan başkanlığında bir komisyon oluşturarak, konunun çözümü için rapor hazırlamışlardır. Swan raporunda antibakteriyel ilaçların insan sağlığı na olan sakıncaları ve alınması gereken önlemler öneriler halinde belirtilmiştir. İnsan ve hayvanlarda sağaltım amacıyla kullanılan Penisilin, Streptomisin, Tetrasiklinler gibi antibiyotikleri verim artırma da insan gıdası olarak yararlanılan hayvanlarda kullanılmaması şeklinde çok yönlü değerlendirmeler dikkate alınmış ve çoğu Avrupa ülkesi gıdalardaki antibiyotik kalıntıları hakkında bu öneriler doğrultusunda hareket etmeyi prensip saymışlardır.(4,29)

Sütteki Penisilin rezidülerinin % 90'meme içi anfüzyonlarından sonra antibiyotiğin atılma süresi beklemeden sütün tüketilmesiyle meydana gelmektedir. Bu yolla uygulamalardan kaynaklanan rezidülerin % 60 laktasyon periyodu içinde % 30'u da kuru dönemde mastitis sağaltımları sonucunda oluşmaktadır. Geri kalan % 10'luk rezidüler ise parenteral, intramammal veya diğer nedenlerden kaynaklanmaktadır. Kuru dönemde doğumdan 60 gün önce benzil penisilin ile mastitis sağaltımı yapılan ineklerin doğumdan sonra sütlerinde rezidüye rastlanmadığı halde, doğumdan 45 gün önce aynı preparat ile tedavi edilen ineklerde doğumdan 14-15 gün sonraya kadar sütte penisilin rezidüleri saptanmıştır. Parenteral penisilin tedavisi görmüş süt ineklerinin idrar ve sütle antibiyotiği çıkarıkları ortaya konulmuştur. İnsan gıdalarındaki ilaç ve kimyasal madde tolerans limitleri Gıda ve İlaç örgütü (FDA) tarafından belirlenmektedir. Yeni araştırma bulgularının dikkate alınarak değerlendirilmesiyle ilaçların eliminasyon süreleri ve tolerans limitleri değiştirebilmektedir. Penisilinlerin sığırlarda dokulardan ve sütle atılma süreleri

belirlenerek açıklanmış bulunmaktadır. (6,10,24,25)

Veteriner sağaltımında en çok başvurulan antibiyotiklerden birisi de tetrasiklinlerdir. Tetrasiklinler büyük ölçüde idrarla atılmakta ve ikinci derecede de safra yoluyla atılmaktadır. Bu yolla barsaklara geçen tetrasiklinlerin bir kısmı tekrar emilerek entero-hepatik dolaşımına katılırlar. Kullanım durumuna göre bu grup antibiyotikler büyük ölçüde sütle de atılmaktadır. Tetrasiklin gurubu antibiyotikler paranteral olarak kullanıldıkları gibi meme preparatı olarak da kullanılmaktadırlar. Tetrasiklinlerin sığırlarda dokulardan atılma süreleri ve sütten atılma süreleri ile tolerans limitleri belirlenerek oral ve enjektabil formülasyonlar hakkında özellikle, ilacın kullanım şekli hakkında açıklayıcı bilgiler bildirilmiştir. (6,7,24,26,31)

Penisilin ve tetrasiklinler gibi sağaltım amacıyla kloramfenikolden de yararlanmaktadır. Oral ve paranteral yolla uygulanan bu antibiyotik idrardanbaşka sütle de atılmaktadır. Fakat sütle atılma esas olarak mastitis sağaltımında intramammal infüzyonlardan sonra meydana gelmektedir. Kloramfenikol grubu antibiyotiklerin ciddi infeksiyonların dışında kullanılması gerektiği vurgulanmakta ve özellikle hafif infeksiyonlarda ve koruyucu amaçla kullanılmasının sakıncalı olduğuna değinilmektedir. Neutropen, agranulositozis veya şiddetli olgularda aplastik anemi ile birlikte kemik iliği dejenerasyonuna yol açabildiği de bildirilmiştir. Kloramfenikolün kesim öncesi atılma zamanı ile sütle atılma zamanı hakkında açıklayıcı çalışmalar yeterince yapılmadığı gibi günlük tolere edilebilen doz miktarı da kesin olarak bilinmemektedir. (1,8,14,15,16,19,28)

Günümüzde rezidü tayinlerinde mikrobiyolojik, immunolojik, kimyasal kromatografik metotlar uygulanmaktadır. Hayvansal ürünlerde antimikrobiyal madde kalıntılarının aranmasında gelişmiş laboratuvar tekniklerinin yanısıra çiftliklerde, mezbahalarda ve mandıralarda çabuk ve kolayca uygulanabilecek ön tarama testleri de geliştirilmiştir. Sütteki ön tarama testleri liyofilize edilip renk indikatörü emdirilmiş bakteri tablet ya da ampullerinin belirli miktarda süte katıldıktan yaklaşık 3-4 saat sonra antimikrobiyal madde varlığı halinde bakteri üremesinin gerçekleşmeyip, süt renginin aynı kalması ya da inhibitör madde yokluğunda bakterilerin üreyip, süt renginin değişmesine göre değerlendirilmektedir. Mikrobiyolojik yöntemde esas, antibiyotiklere duyarlı B.subtilis, S.lutea, B.megatorium, B.steareothermophilus, M. Luteus vb.

mikroorganizmaların uygun agar besiyerinde üretilmesine başlanırken, aynı anda disklere emdirilmiş ya da çukurlara konulmuş hayvansal ürün homojenizatının uygun ısıda belirli bir süre inkubasyona bırakılmasına dayanmaktadır. Sonuçta disk ya da çukur etrafında antimikrobiyel varlığında mikropsuz zonların meydana gelişi dikkate alınarak karar verilmektedir. Diğer taraftan antibiyotik rezidülerin saptanmasında, özellikle, tolerans limitleri esas alınarak hassas ölçümlerin yapılmasında gaz kromatografik, likit kromatografik, mass spektrofotometri, biyootografi ve infrared spektrofotometrik teknikler kullanılmaktadır. (2,5,10,14,15,19,33).

Hayvansal besinlerdeki kalıntıların belirlenmesinde kullanılan kromatografik yöntemlerden gaz kromatografi metodu ile yapılan çalışmalarda süt ve dokulardaki kloramfenikol rezidülerinin 5ng/g'a kadar saptanabildiği belirtilmektedir. Bazı araştırmacılar mikrobiyolojik ölçümlerde kloramfenikol rezidülerini sütte 0.025 ug/ml, kas dokularında 0.1 ug/g düzeyinde saptamışlardır. Sütteki benzil penisilin tolerans limitinin 4 ug/kg, tetrasiklinler için bu limitin yine sütte 100 ug/kg ve kloramfenikol için sütteki rezidüsünün tolerans limiti ise (0) olarak kabul edilmektedir. (9,23,27,28)

Bu çalışmada, kloramfenikol, penisilin ve tetrasiklin gibi mastitis sağaltımında kullanılan antibiyotiklerin çeşitli yöntemler uygulayarak sütteki varlığının belirlenmesiyle bunların süttten atılma sürelerinin tespiti amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Denemelerimizde süt sığırcılığı yapılan Bala, Polatlı, Lalahan Tarım İşletmeleri Müdürlüğündeki inekler, Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü deneme hayvanları ünitesinde bulunan inekler ile Ankara Şeker Fabrikasının süt sığırlarından yararlanıldı. Bahsi geçen işletmelere çalışma dönemleri içerisinde gidilerek hayvanlara CMT uygulandı ve testle pozitif sonuç veren ineklerden süt örnekleri aseptik koşullarda alınarak labarutuvarda incelemeye alındı.

İzolasyon Çalışmaları: CMT testi sonucunda alınan süt örneklerinin Fossomatikle somatik hücre sayıları saptandı. Somatik hücre sayıları

500.000'in üzerinde olan süt örneklerinden kanlı gara, eskünli kanlı agar, MacConkey agar gibi besiyerlerine ekim yapılarak izole ve edinfiye edilen etkenlerin Kibry-Bauer yöntemine göre antibiyogram testleri uygulandı. Her işletme bazında Kloramfenikol, penisilin ve Tetrasikline duyarlı hayvanlar belirlendi.

Besiyerleri: İzolasyon ve identifikasyon amacıyla zenginleştirilmiş kanlı agar, Mac Conkey agar, Hippuratlı besiyeri, Eskülinli kanlı agar, DST agar, Muller Hinton agar, Nutrient agar gibi katı ve buyyon gibi sıvı besiyerlerinden yararlanıldı.

Sağaltım Çalışmaları: Antibiyogram testi sonucuna göre her işletmeden Kloram fenikol, Penisilin ve Tetrasiklin'e duyarlı oldukları saptanan üç süt ineği ayrılarak bu hayvanlarda ayrı ayrı antibiyotik uygulamaları ile sağaltıma başlandı. Kullanılan ilaçların dozları prospektuslarına göre Kloramfenikol için 50 kg. canlı ağırlığında 2 ml., Tetrasiklin için 10 kg. canlı ağırlığında 1 ml. ve Penisilin için kg. canlı ağırlığına 10 İ.Ü. olacak şekilde ayarlandı. İlaçlar sabah sağımlarından sonra kas içi, akşam sağımlarından sonra ise meme içine infüzyon yolu ile uygulandı. Sağaltıma üç gün süre ile devam edilerek son uygulamadan 12 saat sonra başlanarak 4 gün süre ile süt örnekleri alındı.

İlaçların Sütten Atılma Sürelerinin Saptanması: Bu amaçla antibiyotiklerin sağaltım dozunda uygulanmasını takiben dörder saat aralıklarla ya da bu sağlanamadığında sabah ve akşam sağımları sırasında aseptik koşullarda hayvanların süt örnekleri toplandı. Alınan süt örnekleri doğal inhibitörlerin giderilmesi için 95 °C'ye kadar ısıtıldı ve +4 C de muhafaza edilerek denemelerde kullanıldı. İlaçların sütten atılma sürelerinin saptanmasında intertest yöntemi, Three Plate Diffüzyon yöntemi, Biyootografi, Gaz Kromatografi yöntemlerinden yararlanıldı.

1. İntertest Yöntemi: Antibiyotiklere duyarlı bir mikroorganizma olan Str. thermophilus'un bulunduğu ve indikatör bir boya içeren hazır test materyali veya laboratuvarımızda liyofilize edilerek indikatör boyalı şekilde mevcut olan aynı mikroorganizma kullanılmak suretiyle sağım sonraları alınan süt örnekleri test edildi. Test uygulama sonucunda meydana gelen renk değişikliğine göre değerlendirme yapıldı. 45 C'ye ayarlı su banyosunda ısıtılan 2.5 ml. süt örneği üzerine 1 intertest tableti atılarak 45 C'de 3 saatlik bekleme süresinden sonra sarı rengin oluşumu negatif, mavi-yeşil rengin oluşması ile pozitif olarak

değerlendirildi.

2. Three Plate Diffüzyon Yöntemi: Bu amaçla steril Whatman No. 4 filtre kağıdından hazırlanmış 9 mm. çapındaki diskler kullanıldı. Diskler test edilecek süt örneklerine daldırıldıktan sonra antibiyotiğe çok duyarlı bir mikroorganizmanın (Penisilin, Tetrasiklin, Kloramfenikol için B. stearothermophilus ayrıca Tetrasiklin için B. subtilis, Kloramfenikol için ise B. megaterium kullanıldı) 18 saatlik sıvı kültürün ekim yapılmış olan katı besiyeri üzerine 2 cm. aralık olacak şekilde yerleştirildi. Ortaya kontrol diskleri de konulduktan sonra petri kutuları kullanılan duyarlı mikroorganizma cinsine göre sırası ile 55 C, 30 C ve 37 C'de inkübasyona bırakıldı. Bu amaçla penisilin için B. stearothermophilus inokule edilen petripler 55 C'de 5-6 saat, Tetrasiklin için B. subtilis ile inokule edilen petripler 30 C'de 18-24 saat ve Kloramfenikol için ise B. megaterium inokule edilen petripler ise 37 C'de 5-6 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İşlenen örneklerde antibiyotik varlığında üremenin olmadığı zonların çapı saptanarak değerlendirilme yapıldı. Disklerin etrafında 1 mm'den fazla zon oluşturan örnekler pozitif değer olarak kabul edildi.

Test Suşları: ThreePlate Diffüzyon yönteminde yararlanılan antibiyotiklere duyarlılığı bilinen B. subtilis Strain ATCC 6633, B. stearothermophilus var. Colidolactis Strain C 953 ve B. megaterium Strain ATCC 9085 standart suşları Etilik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Antibiyotik Disk Üretim Laboratuvarları kültür koleksiyonundan sağlandı ve denemelerde kullanıldı.

3. Biyootografi Yöntemi: Biyootografi denemeleri Neidert ve ark (21) tarafından bildirilen prosedüre göre yapıldı. Bu amaçla Kloramfenikol, Penisilin ve Tetrasiklin için işlenen süt örneklerinden ekstraksiyonlar hazırlandı. Her üç antibiyotik için developmen çözücü ve developmen hazırlanarak silikajel G plakaları kullanıldı.

Biyootografi Yönteminin Uygulanışı: Eritilmiş, 121 C'de 15 dak. sterilize edilmiş 100 ml. antibiyotik medium No.11 (Seed agar) 55 C'ye soğutulduktan sonra besiyerindeki konsantrasyonu 5x10 spor/ml olacak şekilde B. subtilis spor süspansiyonundan ilave edilip besiyeri karıştırıldı. Homojen dağılım sağlandıktan sonra besiyeri sterilize edilmiş bioplate dökülüp düzgün bir yüzeyde eşit yayılımı sağlanarak katılaşmaya bırakıldı. Bu şekilde bioplate kullanıma hazır hale geldi. Diğer taraftan TLC esaslarına göre hazırlanmış silika jel plakaları aktive edildikten sonra plakalar havada kurutuldu ve hazırlanmış

olduğumuz bioplate ile yüzyüze gelecek şekilde 15 dak. beklendikten sonra bioplate'ler üzerinden TLC plakaları kaldırıldı. Daha sonra bioplate'ler 35 C'de bir gece ters çevrilmek suretiyle inkube edildi. Bu süre sonunda bütün inhibisyon zonlarının lokalizasyonu not edildi ve standart zonlarla karşılaştırılarak değerlendirildi.

4. Gaz Kromatografi Yöntemi: Bu yöntemle sadece sütte Kloramfenikol varlığı araştırılmış olup yöntemin uygulanışında Nelson ve arak. (22) tarafından bildirilen metod modifiye edilmiştir. Yöntemde, Kloramfenikol, Kloramfenikol-meta-isomer, Cartridges-Seppak C18 RP, Pyridine, Chlorotrimethylsilane, Hexomethyldisilazone, Metanol, Kloroform, Asetonitril, N-hekzan, İzooktan, N2 gazı, argon-metan analitical grade'ye uygun ajanlardan yararlanıldı.

Süt Ekstraktının Hazırlanışı: Diffüzyonda 4.günde alınan örnekler ile bir önceki örneklerden ekstraksiyon hazırlandı. 5 ml süt örneği santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine konsantrasyonu 50 ng/ml olan metanolde eritilmiş standart solüsyondan 2 ml ilave edildi sonra 700 rpm'de 15 dk. bekletildi. 10ml etil asetatla iki defa homojenize edildi sonra 700 gazı altında 60 c'de kuruyuncaya kadar uçuruldu. Rezidü 0.2 ml metanol ve 2.8 ml IN C 18 mini kolon 2 ml metanol bunu takiben 5 ml bidistile su ile yıkanarak şartlandırıldı. Rezidü ihtiva eden solüsyon şartlandırılan kolondan geçirildi. İlk baştaki fraksiton (3 ml) atıldı. Kloromfenikol iki defa 3 ml'lik volümler halinde metanol + 1 N HCL (40+60) kullanılarak kolondan elüe edildi. Bu fraksiyonlar vidali kapaklı konik santrifüj tüpünde toplandı ve metanol azot gazı altında 60 C'de uçuruldu. Sulu faz iki kere 2 ml'lik volümler halinde etil ase:la ekstrakte edildi. Toplanan ekstrakt temiz konik santrifüj tüplerine kondu ve yukarıda tarif edildiği gibi uçuruldu. Rezidü, 1 ml metanol ile tüp yıkanarak yeniden eritildi. Azot altında metanol uçuruldu ve 400 ul trisil ilave edildi. Tüp kapatıldı ve vortekste bir kaç saniye çalkalandıktan sonra 35 C' de 30 dk. bekletildi.

Gaz Kromatografi Metodu: Analizlerde Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstütüsü Ünitesinde bulunan Schimatzu Gaz kromatografi cihazından yararlanılmıştır. Elektron Capture dedektör (ECD), 55 m uzunluğunda kapillar kolan kullanılmıştır. Koloan sıcaklığı 200 C, taşıyıcı gaz azot, akış hızı 1.5 ml/dakikadır.

Likit Kromografi Metodu: Bu yöntemle sadece sütte Tetrasiklin varlığı araştırılmış olup yöntemin uygulanışında Long ve ark. (18)'nin bildirdikleri

prosedürden yararlanıldı. Belirtilen yöntemle göre hazırlanan süt örneklerinin analizinde Enstitüdeki cihaz kullanıldı.

Cihazda işlenen süt örneklerinin ekstraksiyonu diffüzyon yönteminde son zon veren örnek ile bir önceki ve bir sonraki örnekler olmak üzere üç örnekten hazırlanmış ve bu üç örneklerde Tetrasiklin varlığı araştırılmıştır.

Likit kromatografiye uygun solvetler ve üç kez distile edilmiş su kullanıldı.

Likid Kromatografik analiz: Fotodiode dedektör, 365 nm ve dalga boyu aralığı 10-450 nm., kullanıldı. Mobil faz 0.01 M sulu okzalit asit+asetonitril (7+3), akış hızı 1 ml/dak. ve kolon oktadesilsil ile derivatize edilmiş silika kolon idi.

Standart eğrisinin hazırlanması için 100,200,400,800,1600,3200 ng/ml'den 20 ul volümlerinde cihaza enjekte edildi. Bu işlem beş kez tekrarlandı.

Kolon materyeli: 22 g C 18 tartılıp 50 ml'lik temiz bir enjektöre konuldu ve kolonu dolduracak şekilde bunun üzerinden iki kez hekzan, iki kez metilen klorid, iki kez metanol geçirildi. Bu vakumda kurutuldu.

Ekstraksiyon İşlemi: 2 g C18, 0.05 g Na₂EDTA ve 0.05 okzalik asit bir havan içine konuldu ve üzerine 0.5 ml. süt ilave edildi. Her numuneye standart tetrasiklin solüsyonlarından 10 ul konulup 1 dak beklendi. Numune mekanik olarak iyice karıştırıldı. Kör olarak kullanılan örnekler de aynı şekilde hazırlandı. Ancak bunlara tetrasiklin standartı konulmadı. Karışım homojen hale getirildikten sonra, 10 ml'lik bir plastik enjektörün tabanına Watman No.1 filtre kağıdı konularak hazırlanmış olan kolona aktarıldı. kolondan önce 8 ml hekzan geçirildi. Elüe etmek için 8 ml etil asetat + asetonitril (1+3) karışımı kolondan geçirildi. Elde edilen ekstrakt azot gazı altında 40 C'de su banyosunda uçuruldu. Kuru rezidüye 0.5 ml mobil faz ilave edildi ve 5-10 dak sonike edildi. Bu homojenat santrifüj edildikten sonra elde edilen temiz süpernatanttan 20 ul cihaza verildi.

BULGULAR

İzolasyon Çalışma Sonuçları: CMT uygulanarak hayvanlardan alınan süt örneklerinin fossomatikle somatik hücre sayıları ile ml'sinde 500.000'in üzerinde olan sütlerden yapılan bakteriyolojik muayene sonucunda izole ve idenfiye

edilen etkenler arasında *Staph. aureus* (% 33), *Staph. epidermidis* (% 11), *Str. agalactiae* (% 0.9), *Syr. uberis* (% 2), *Str. faecalis* (% 0.3), *Corynebacterium* sp. (% 0.9), *E. coli* (% 14), *Bacillus* sp. (% 0.6) ve miks infeksiyon etkeni olarak tespit edilen *Staph. aureus* 4 *Staph. epidermitis* (% 0.1), *E.coli* + *Staph. sp.* + *Corynebacterium* sp. + *Str. sp.* (% 0.4) ve *Staph. sp.* + *Str.sp.* (% 0.6) yer aldığı görülmüştür. Çalışma süresince izole ve identifiye edilen etkenler ile bunların antibiyotiklere karşı duyarlılık durumları Tablo-1 'de gösterilmiştir.

İlaçların Sütle atılma Sürelerinin Saptanmasında alınan Sonuçlar. izolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucuna göre kloramfenikol, tetrasiklin ve penisiline duyarlı oldukları saptanan hayvanlar arasından her antibiyotik için 1 adet olmak üzere ayrılan ineklere bu antibiyotiklerin sağaltım dozları ile 3 gün süreyle tedaviye başlanmıştır. Son ilaç uygulamasından 12 saat sonra 4 gün süre ile sabah ve akşam sağımlarından sonra ilaç uygulamasından 12 saat sonra 4 gün süre ile sabah ve akşam sağımlarından sonra alınan süt örneklerinde uygulanan antibiyotiklerin atılımı ve atılma süreleri intertest yöntemi, Three Plate Diffüzyon yöntemi, Biyootografi, Gaz Kromotografi ve Likit Kromotografi yöntemlerine göre tesbit edilmiştir. İşletme bazında bu çalışmalara ilişkin sonuçlar Tablo 2a,2b,3a,3b,4,5,6,7,8,9,10,11 ve 12'de verilmiştir. Tabloların incelenmesinden anlaşılacağı gibi intertest yöntemi ile her üç antibiyotüğün de 4.gün dahi sütle atıldığını göstermektedir. Three Plate Diffüzyon yönteminde de aynı şekilde intertest sonuçlarına paralel bulgular elde edilmiştir. Biyootografik yöntemin sonuçlarının gösterildiği Tablo 2b ve 3b'nin incelenmesinde ilk üç gün alınan süt örneklerinde pozitif olgular elde edilmiş ancak 4. gün ilk sağımlarda pozitif sonuçlar alınırken sonraki sağımlarda negatif bulgular elde edilmiştir. Görüldüğü gibi bu test intertest ve diffüzyon testi ile aynı sonuçları verdiği için Bala dışındaki örneklerde pratik olmadığından uygulamadan çıkarılmıştır. Three Plate Diffüzyon yöntemi ile yapılan çalışmalarda antibiyotiklere duyarlı olduğu bilinen standart suşlardan *B. stearothermophilus*'un *B. subtilis* ve *B. megaterium*'a oranla daha duyarlı olduğu gözlenmiş ve belirgin zonlar oluşturduğu saptanmıştır. Oluşan zon çaplarınının 10-30mm arasında değişmek üzere süre ve sağım sırasına göre farklı değerler gösterdiği Tabloların incelenmesinden anlaşılmaktadır.

Kromatografik çalışma sonuçlarının gösterildiği Tablo-12'nin incelenmesinde diffüzyon yöntemi ile en son zon veren süt örneklerinde tetrasiklinin varlığı

gözlenebildiği gibi gaz kromatografi ile de kloramfenikolün varlığı ortaya konulmuştur. Denemeler sonucunda kloramfenikol, penisilin ve terasiklinin üç günlük bir uygulamadan sonra en son ilaç verilmesinden başlamak üzere en az 4 gün süre ile süttten atıldıkları ortaya konulmuştur.

TARTIŞMA

Antimikrobiyal kemoterapotik maddeler ve özellikle, antibiyotikler günümüzde bir çok alanlarda kullanılmaktadır. Bunların başında da sağaltım amacıyla kullanım gelmektedir. Süt ineklerinde sıklıkla karşılaşılan hastalıklar arasında yer alan mastitisin sağaltımında da antibiyotikler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak uygulanan ilaçların eliminasyon süresi bitmeden hayvansal orjinli besin maddelerinin et, süt ve yumurta olarak insanların tüketimine sunulması sonucu sağlık açısından sorun yaratacak besin kirliliği konusunu gündeme getirmektedir. Nitekim hayvansal ürünlerde ilaç ve kimyasal madde kalıntıları 1970'li yıllardan sonra önemsenmeye başlanmış, 1980'li yıllarda konu üzerindeki çalışmalar giderek yoğunlaşmıştır. Süt insan sağlığı için gerekli temel besin maddelerinden en önemlisidir. Aynı zamanda süt, organizmaya giren ilaç ve kimyasal maddelerin eliminasyonunda küçümsenmeyecek rol oynamaktadır. Bu nedenle son yıllarda süte katkı ve kalıntı maddeleri üzerine yeni standartlar geliştirme gereği duyulmuştur (16, 20, 30, 32).

Bu çalışmada, mastitisli hayvanlar belirlenerek bunlardan izole edilen etkenlere karşı penisilin, Kloramfenikol ve tetrasikline duyarlılık gösteren hayvanlar ayrılarak bu ineklerin bahsi geçen ilaçlarla sağaltımları gerçekleştirilmiştir.

Kloramfenikol, penisilin ve tetrasiklin grubu antibiyotikler gerek infeksiyöz hastalıklar ve gerekse mastitis sağaltımında sığırlarda sıklıkla kullanılan kemoterapötik ajanlar arasında bulunmaktadır. Bu ilaçlar parenteral ya da meme içi yolla uygulandıklarında, önemli miktarda sütle de atılmaktadır. Antibiyotiklerin süttten atılımını göstermek amacıyla gerçekleştirilen biyolojik yöntemler hem çabuk sonuç vermesi ve hem de uygulanmasının basit olması nedeniyle tercih edilmektedir. Ayrıca mikrabiyojik yöntemlerde

kullanılmaktadır. (10, 14, 15, 19)

Bu çalışmada, hızlı tarama yöntemi olan intertest yöntemi ile *B. subtilis*, *B. megaterium* ve *B. stearothermophilus* kullanılarak uygulanan Three Plate Diffüzyon yöntemi kullanılmıştır. İntertest ve diffüzyon yöntemlerinin uygulanması kolay ve kısa zamanda sonuç vermesi gibi avantajlarının olduğu anlaşılmış ve bu yöntemlere göre sağaltımda kullanılan antibiyotiklerin özellikle penisilin ve kloramfenikolün 4. gün dahi sütle atıldığı ortaya konulmuştur.

Günümüzde rezidü analizlerinde mikrobiyolojik ve immunolojik yöntemler yanında kimyasal-kromatografik ve biyotografik yöntemlerde kullanılmaktadır. Özellikle tolerans limitleri esas alınarak hassas ölçümlerin yapılmasında gaz kromatografik, mass spektrofotometri ve infrared spektrofotometrik teknikler kullanılmaktadır. (9,23,24,25,28)

Bu çalışmada sınırlı sayıdaki örnekle biyotografi, gaz ve likit kromatografi yöntemleriyle Three Plate Diffüzyon metodunda son zon verenden bir önceki ve iki sonraki süt örneklerinde antibiyotiklerin varlığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak ülkemizde, özellikle mastitis sağaltımında kullanılan kloramfenikol, penisilin ve terasislin gibi antibiyotiklerin bilinçli olarak uygulanması gerektiği ve sütle uzun bir süre atılım sözkonusu olduğundan bu konuda titiz davranılması gereği anlaşılmış bulunmaktadır. Ayrıca yemlere tetrasiklin katılmasının önlenmesi ve insan sağlığı açısından zararlı etkisi bulunan kloramfenikol kullanımının yasaklanması ile sağaltıma alınan ineklerden sağılan sütlerin insan tüketimine sunulmasının önlenmesi gerektiği, yine insanlarda bilhassa çocuklarda alerji ve anafaktik şoklara neden olabilen penisilin grubu antibiyotiklerle tedavi edilen hayvanların sütlerinin de en az 4 gün tüketime arz edilememesi gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. ALLEN, E.H (1985): Rewiev of chromatografic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues from food-producing animals J.Assoc. Anal. chem., 68, No.5.
2. ARNOLD,D.and SOMOGYI,A. (1983): Trace analysis of chloramphenicol residues in milk, eggs and meat. Comparisson of gas chromatography and

radioimmunoassay. J. Assoc. Anal. Chem. 68,5,990,999.

3. AYDIN, N. ve ÇOŞKUNER, M.R. (1983): Ankara bölgesinde klinik ve subklinik mastitislere neden olan aerobik mikroorganizmaların ve mantarların izolasyon, identifikasyon ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanması üzerinde çalışmalar. Etlik Vrt. Mikrobiyol. Derg. 5,4-5,7-25

4. AYDIN, N., İSTANBULLUOĞLU, E. ve AYDIN, N. (1984): Yemlere katılan çeşitli antibiyotiklerin, civciv ve piliçlerin barsak florasındaki kaliform grubu bakterilerin direnç durumları üzerine etkisi. Doğa Bilim Derg., Seri D1, 8,1,5-16

5. AYDIN, N., CAMBAZOĞLU, M VE AYHAN, H. (1989): İnterest yöntemiyle sütteki antibiyotiklerin ve diğer inhibitör maddelerin saptanması üzerinde çalışmalar. Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg. 5,6.

6. BOOTH, N.D. and McDONALD, L.E. (1988): Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics. 2. Ed., Williams and Wilkins Comp. Baltimore, USA, 309-363

7. BRANDER, G.C. and Pugh, D.M. (1971): Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics. 6th Ed., Iowa State Univ. Press., 796-820, 1162, 1175.

8. BURROWS, G.E., Tyler, R.D., SANGI AHS, S. and KEETON, R.D. (1988): Experimental chlaramphenicol intoxication in neonatal calves: Intravenous administration. Res. Vet. Sci., 45,101-106.

9. COMMISSION REGULATION E.E.C. (1992): Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medical products in food-stuffs of animal origin. Official Journal of the European Communities.

10. EGAN, J. and O'CONNOR, F. (1984): The suitability of various sampling techniques for determining the concentration and persistence of penicillin in milk samples following intramammary infusion. Irish J. Agric. Res., 23,149-153

11. ENGEL, R.E. (1988): Quality assurance through residue screening J.A.V.M.A., 2,268-271.

12. F.A.O. and O.M.S. (1969): Norme d'identite et de divers antibiotiques. Reunion de la F.A.O. sur nutrition Rapport No.45, O.M.S. additifs alimentaires. 167,34.

13. F.A.O. Food and Nutrition aspects (1979): Manuals of food quality control. 3. Commodities, 14/3.

14. GARY,O. (1987): A comparison of three bioassy techniques for the detection of cloramphenicol residues in animal tissues. *J.Agric. Food Chem.*,35,556-559
15. HAAPOJA,A and KORKEA,L.A. (1984): Antimicrobial residues in milk. Comparison different agar diffusion methods. *Acta Vet. Scand.*, 25,250-259
16. KESKİN,G. (1992): İnce Tabaka Kromatografik/Biyotografik Yöntem ile Sütte Antibiyotik Rezidülerin Aranması. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı TAGEM. Uzmanlık Tezi.
17. N LIVINGSTONE,R.C.(1985): Residues in animal derived food. *J.Assoc. Off. Chem.* 5, 966-967
18. LONG,A.R. HSIEH,L.C.,BELLO,A.C., MALBROUGH,M.S.,SHART,C.R. and BARKER, S.A.(1990): Matrix-Solid-Phase Dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline and chlortetracycline in milk. *J.Assoc. Off.Anal.chem.*, 38,427-429
19. LONG,A.R.,HSIEH,L.C.,BELLO,A.C.,MALBROUGH,M.S.,SHORT,C.R. and BARKER,S.A. (1990): Method for isolation and liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk. *J. Agric. Food Chem.*,38,427-429
20. MİNBAŸ,A.,ERDİNÇ,H. ve BERKER,A. (1989): Hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımının insan sağlığına etkisi. *Uludağ Univ. Vet. Fak. Derg.*, 1-2,3,151
21. NEIDERT,T.E., SASCHENBRECKER,P.W. and TITTIGER,F. (1987): Thin layer chromatographic/bioatografic method of antibiotic residues in animal tissues. *J.Assoc. Off.Anal.Chem.*70,2197-200
22. NELSON,J.R., COPELAND,R.J., CAMPBELL,D.J. and BALACK,W.D. (1983): Sensitive gas-liquid chromatographic method of chloramphenicol in animal tissues using electron capture detection.*J.Chromatoh.*,276,438-444
23. NOUWS,J.F.M. (1988): Monitoring milk for cloramphenicol residues by an immunoassay (Quick-Card). *The vet. Qard.*, 10,4
24. NOUWS,J.F.M (1990): Injection sites and withdrawal times. *Ann. Reh.Vet.* 1,145-150
25. NOUWS,J.F.M., SUMULDERS,A. and PAPPALINI,M. (1990): A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations. Administered intramuscularly to calves. *The Vet. Quart.*, 3,129-

138

26. ONJI, Y., UNO, M. and TANIGAWA, K. (1984): Liquid chromatographic determination of tetracycline in meat and fish. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 6, 1135-1136

27. RÜSCH, P., GLORR, C., INDERMAUR, B. and HASSIG, M. (1992): Comparati ve studies of the efficacy of different intramammary preparations and the duration of antibiotic excretion in milk. Tierärztliche Umschau. 47, 2, 94-99

28. SCHWARZER, C. (1986): Pattern of chloramphenicol levels in the udder secretion of cows after intramammary administration of tardomyocel-L suspension at draught off. Vet. Med. Rew., 1, 50-54

29. SWAN, M. M. J. (1969): Joint Committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Her Majesty's Stationary Office. London, 1-60

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

31. ŞANLI, Y., KAYA, S. (1991): Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağlık Seçenekleri. 1. Baskı, Medisan Yay. 4, 553-603

32. ŞANLI, Y., AYDIN, N., İZGÜR, M., AKMAN, A. ve BAYDAN, E. (1987): Sağlıkta bazı antibiyotiklerin hayvan yetiştiriciliğinde verim artırıcı ve koruyucu amaçlarla kullanımı sonucu bakterilerde gelişen direnç olgusunun in vivo ve in vitro olarak duyarlı mikroorganizmalarla araştırılması. Doğa TÜ Vet. Hay. D.C., 11, 72-85

33. ZIV, G., BOGIN, E. and SULMAN, F. G. (1973): Blood and milk levels of chloramphenicol in normal and mastitic cow ewes after intramuscular administration of chloramphenicol sodium succinate. Zbl. Vet. Med., A, 20, 801-811