

HAYVANSAL DOKULARDA ANTİBİYOTİK KALINTILARININ AGAR DİFFÜZYON TEKNİĞİ İLE TAYİNİ

*Determination of antibiotic residues in the animal tissues by agar
diffusion technique.*

Ahmet ACET¹
Mehmet ATEŞ²
Osman ERGANİŞ³

Summary : After oxytetracycline (20 mg/kg) and tetracycline (50 mg/kg) were given orally to the broiler chickens, antibiotic residues in tissues were determined by agar diffusion technique. *Bacillus cereus* (ATCC 11778) was used as a sensitive strain. Petri dishes punched at 8 mm in diameter were incubated at 37°C overnight. A total of 124 tissues was tested. The oxytetracycline and tetracycline residues that have been found in tissues were respectively 0.32 - 2.56 µg/gr and 0.080 - 0.240 µg/gr. The limites of the test strain sensitivity were determined 0.04 µg and 0.01 µg levels for oxytetracycline and tetracycline respectively.

Özet : Oksitetrasiklin (20 mg/kg) ve tetrasiklin (50 mg/kg) ağız yoluyla Broiler piliçlerine verildikten sonra dokulardaki antibiyotik rezidüleri agar diffüzyon tekniği ile tayin edildi. Duyarlı suş olarak *Bacillus cereus* (ATCC 11778) kullanıldı. Agar plaklarında 8 mm lik delikler açılmış petriler 37°C de bir gece inkube edildi. Toplam 124 doku numunesi incelendi. Dokulardan tesbit edilen antibiyotik rezidülerinin oksitetrasiklin için 0.32 - 2.56 µg/gr, tetrasiklin için ise 0.080 - 0.240 µg/gr arasında olduğu belirlendi. Test suşunun duyarlılık sınırının oksitetrasiklin ve tetrasiklin için sırasıyla 0.040 µg ve 0.01 µg düzeylerinde olduğu belirlendi.

Giriş

Tetrasiklinler çeşitli streptomices kültürlerinden izole edilen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Tetrasiklinlerin doğal ve yarı sentetik ol-

- (1) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Vet. Fak. Farm. ve İç Hast. Anabilim Dalı, Konya.
- (2) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Vet Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.
- (3) Dr., S. Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

mak üzere sekiz türevi bulunmaktadır. İnsan ve hayvanların çeşitli bakteriyel hastalıklarının kontrolü ve tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar. Ayrıca besi ve kümes hayvanlarında verim artışı sağlamak amacıyla da gıdalara ilave katkı maddesi olarak katılmaktadırlar (3).

Dokulardaki tetrasiklin ve oksitetrasiklin kalıntılarının mikrobiyolojik yöntemler ile tayininde test suşu olarak *Bacillus subtilis* (5, 7, 13), *Bacillus cereus* (1, 11, 13), *Bacillus sterothermophilus* (4, 6) ve *Sarcina lutea* (10) kullanılmıştır.

Ziv (13), sığırlara parenteral olarak oksitetrasiklin vererek serum-ilaç konsantrasyonunu tayin etmiştir. Araştırmacı serumdaki mevcut oksitetrasiklin konsantrasyonu 1.0 µg/ml.den büyük olduğunda test suşu olarak *Bacillus subtilis*'in 0.1 - 1.0 µg/ml düzeylerinde ise *Bacillus cereus*'un kullanılmasını önermektedir.

Oksitetrasiklinin (50 mg/kg) domuzlara oral olarak verildiği bir çalışmada (2), hayvanın çeşitli organ ve dokularındaki kalıntıları aranarak, ilaç uygulamasından iki saat sonra serumda maksimum düzeyde olduğu, 48 saat sonra ise kalp, dalak, troid ve adrenal bezlerde tesbit edilemediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada tek doz oksitetrasiklin uygulamasının dokularda kalıntı yapmadığı belirlenmiştir.

Nouws ve König (9) koyunlara intra musküler yolla oksitetrasiklin vererek, ilacın göz yaşındaki konsantrasyonunu agar diffüzyon yöntemi ile tesbit etmişlerdir. Parenteral oksitetrasiklin uygulamasının keratokonjunktivitis tedavisinde kullanılabileceği bildirilmektedir.

Hayvanlara parenteral yolla farklı konsantrasyonlarda oksitetrasiklin enjeksiyonlarının yapıldığı bir çalışmada (8) %10 luk çözeltinin %20 lik çözeltiliye göre enjeksiyon bölgesinde daha az iritasyon olduğu ve kalıntı bırakmadığı bildirilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, tavuk doku ve organlarında tetrasiklin grubu antibiyotiklerin kalıntı durumlarını ekonomik, basit ve duyarlı bir yöntem olan agar diffüzyon tekniği ile incelemektir.

Materyal ve Metot

Materyal olarak, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma kümesinden sağlanan 28 adet Broiler piliç kullanıldı. Oksitetrasiklin ve tetrasiklin antibiyotikleri Sigma ilaç firmasından, test mikroorganizması olarak kullanılan *Bacillus cereus* ATCC 11778 suşu Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü'nden temin edildi.

Numunelerin analizinde Arret ve ark. (1) ve Thorpe (12)'nin kullanmış oldukları metotlar esas olarak alındı.

Deney hayvanlarına antibiyotiklerin verilmesi ve dokuların alınması: Oksitetrasiklin (20 mg/kg) ve tetrasiklin (50 mg/kg) Broiler piliçlerine ağız yoluyla verildi. Antibiyotikler hayvanlara verildikten sonra, 0, 2.5, 8, 24, 72, 120 ve 168. saatlerde hayvanlardan plazma, beyaz kas, kırmızı kas, karaciğer ve böbrek dokuları alındı.

Dokuların alınması :

Plazma : Kan numuneleri, içinde 10 ünite heparin bulunan 10 ml.lik santrifüj tüplerine alındı. 4.000 dak/devir de 10 dakika santrifüj edildikten sonra plazmaları çıkarıldı.

Kas : 10 gr. kas dokusu 0.1 M glisin buffer (pH: 2)'in 5 ml.si ile ultra homojenizatörde homojen hale getirildi.

Böbrek : 10 gr. böbrek, buffer kullanılmaksızın ultra homojenizatörde homojen hale getirildi.

Karaciğer : 10 gr. karaciğer, 10 ml. glisin buffer (pH: 2) ile ultra homojenizatörde iyice homojen hale getirildi.

Doku homojenatları ve plazma 10 ml.lik santrifüj tüplerine konarak analiz işlemlerine kadar -15°C de dipfiriz de bekletildi.

Agar plakalarının hazırlanışı : Pepton 6.0 gr., Yeast extract 3.0 gr., Beef extract 1.5 gr., Agar 1.0 gr., distile su 1.000 ml. ve pH 6.55 olacak şekilde besi yeri hazırlandı. Hazırlanan besi yeri petri kutularına (160 x 15) 20 ml. miktarında döküldü. Buz dolabında soğutulduktan sonra, 8 mm. çapında, biri ortada diğerleri çevrede olmak üzere 6 delik açıldı. Deliklerin alt kısmı 1 damla eritilmiş besi yeriyle kapatıldı. Sterilite kontrolü için 37°C de 1 gün etüvde bekletildi.

Testin yapılışı : 8 mm çapında delikler açılmış besi yerine 16 saatlik Bacillus cereus kültürü sıvayla yayıldı ve 5 - 10 dakika bekletildi. Her bir çukura numuneler eşit miktarlarda (plazma 0.2 ml, dokulardan 250 mg) konarak, 37°C de 16 - 18 saat inkübasyona bırakıldı.

Okunması : Numunelerin bulunduğu çukurların çevresindeki inhibisyon alanlarının çapı ölçüldü. Standart eğriden dokulardaki oksitetrasiklin ve tetrasiklin konsantrasyonları tayin edildi.

Bulgular

Grafik 1 ve resim 1, 2 de görüldüğü üzere tetrasiklin ve oksitetrasiklin için standart eğriler hazırlandı. Bu metodun duyarlılık sınırının tetrasiklin için 10 ng, oksitetrasiklin için ise 40 ng olduğu tesbit edildi.

Oksitetrasiklin (20 mg/kg) Broiler piliçlerine ağız yoluyla verildik-

ten sonra, 0, 2.5, 8, 24, 72, 120 ve 180. saatlerde hayvanlardan plazma, böbrek, karaciğer, beyaz kas ve kırmızı kas numuneleri alındı. Tablo 1 ve resim 3 de görüldüğü gibi yalnız böbrek numunelerinde oksitetrasiklin kalıntıları tesbit edildi. Hayvanlara oksitetrasiklin verildikten 2.5 saat sonra alınan böbrek numunelerinde kalıntı bulunduğu halde, 72 saat sonrakilerde belirlenemedi. Böbrek numunelerinde tesbit edilen oksitetrasiklin yoğunluklarının 0.32 - 2.56 $\mu\text{g}/\text{gr}$ arasında olduğu görüldü.

Hayvanlara tetrasiklin (50 mg/kg) ağız yoluyla verildikten sonra, 0, 2.5, 8, 24, 72, 120 ve 180. saatlerde, plazma, böbrek, karaciğer, beyaz kas ve kırmızı kaslardaki ilaç kalıntıları arandı. Tetrasiklin kalıntıları plazma hariç tüm dokularda 2.5. ve 8. nci saatlerde tesbit edildi (Tablo 2, resim 4, 5, 6).

Dokularda belirlenen tetrasiklin yoğunluklarının sırasıyla böbrek 0.240. - 0.400 $\mu\text{g}/\text{gr}$, karaciğer 0.120. - 0.160 $\mu\text{g}/\text{gr}$, beyaz kas. 0.100 $\mu\text{g}/\text{gr}$ ve kırmızı kas için 0.080 - 0.092 $\mu\text{g}/\text{gr}$ arasında olduğu görüldü. Genellikle hayvanlara ilaç verilmesinden yaklaşık 24 saat sonra, analizi yapılan numunelerde tetrasiklin rezidüleri tesbit edilemedi.

Tablo 1. Hayvansal dokularda ($\mu\text{g}/\text{gr}$) ve plazmada ($\mu\text{g}/\text{gr}$) tesbit edilen oksitetrasiklin yoğunlukları.

Süre (Saat)	Plazma		Böbrek		Karaciğer		Beyaz Kas		Kırmızı Kas	
	Z	O	Z	O	Z	O	Z	O	Z	O
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2.5	—	—	18	0.96	—	—	—	—	—	—
8	—	—	13	0.32	—	—	—	—	—	—
24	—	—	25	2.56	—	—	—	—	—	—
72	—	—	21	1.92	—	—	—	—	—	—
120	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
180	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

O. Oksitetrasiklin yoğunluğu ($\mu\text{g}/\text{gr}$).

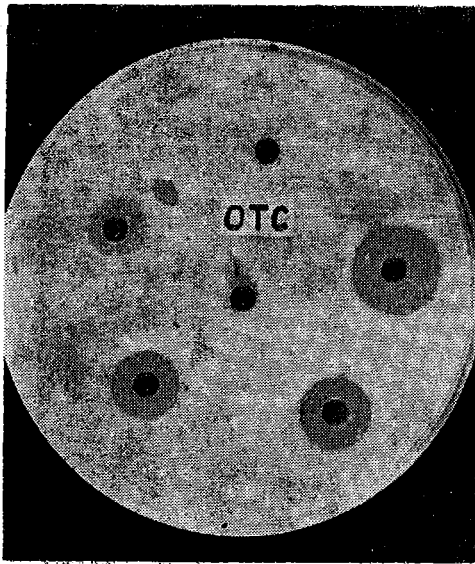
Z. Zonlar (mm).

Tablo 2. Hayvansal dokularda ($\mu\text{g}/\text{gr}$) ve plazmada ($\mu\text{g}/\text{gr}$) tesbit edilen tetrasiklin yoğunlukları.

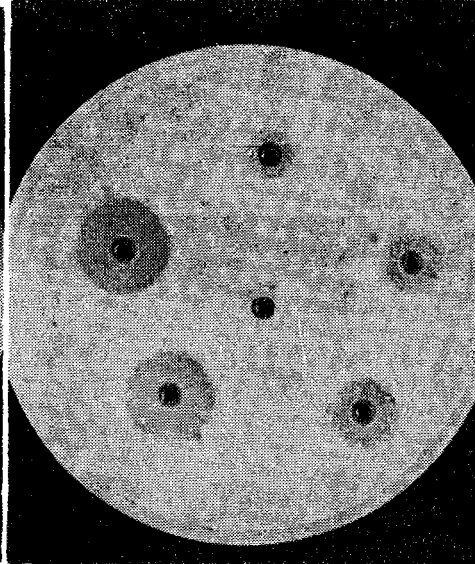
Süre (Saat)	Plazma		Böbrek		Karaciğer		Beyaz Kas		Kırmızı Kas	
	Z	T	Z	T	Z	T	Z	T	Z	T
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2.5	—	—	21	0.400	14	0.120	13	0.100	12	0.080
8	—	—	18	0.240	16	0.160	13	0.100	—	—
24	—	—	—	—	—	—	—	—	13	0.092
72	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
120	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
180	—	—	17	0.200	—	—	—	—	—	—

T. Tetrasiklin yoğunlukları ($\mu\text{g}/\text{gr}$).

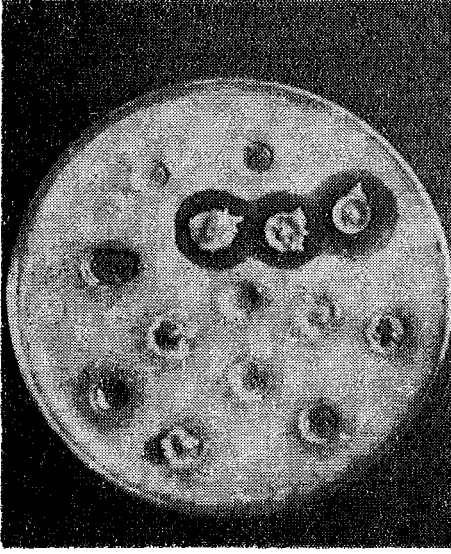
Z. Zonlar (mm).



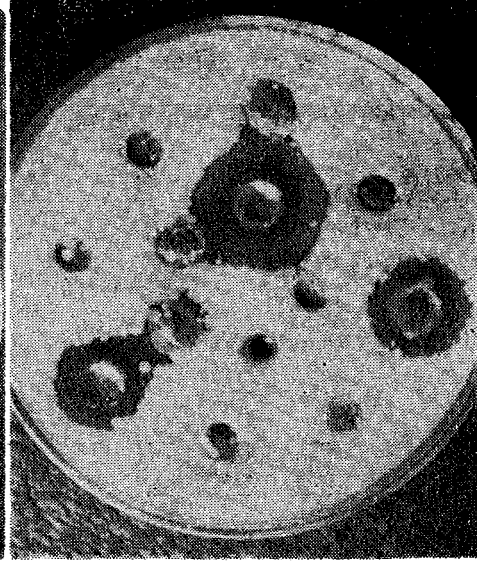
Resim 1. Standart oksitetrasiklin'in inhibisyon zonları (mm). (The zones of inhibition of the standart oxytetracycline).



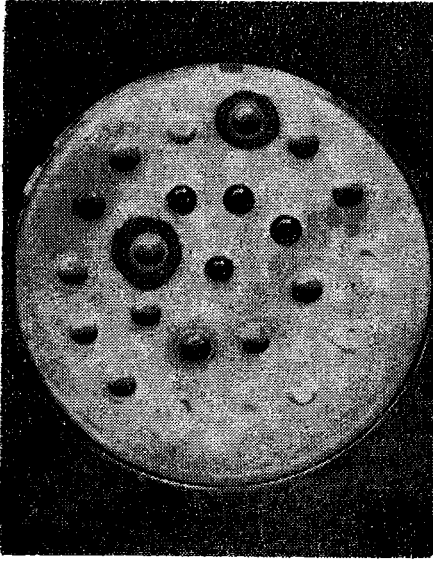
Resim 2. Standart tetracyclin'in inhibisyon zonları (mm). (The zones of inhibition of the standart tetracycline).



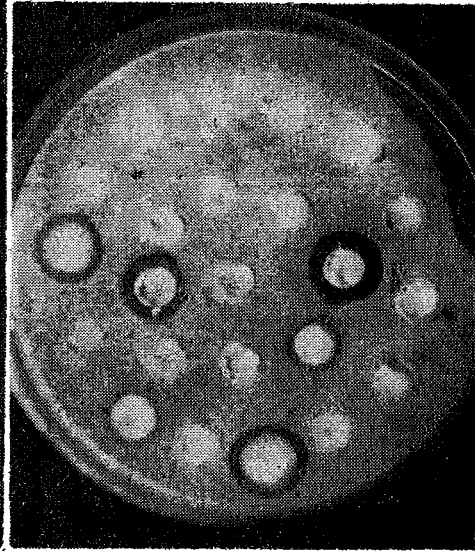
Resim 3. Böbrek oksitetrasiklin düzeyleri.
(Kidney oxytetracycline levels).



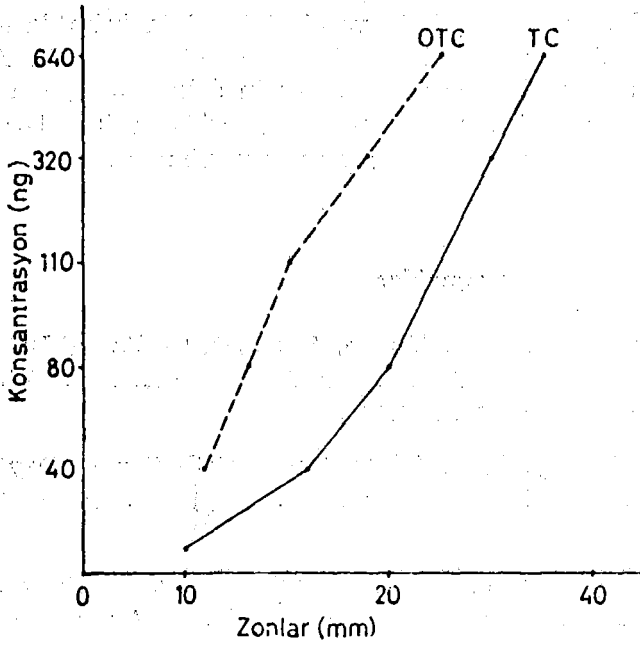
Resim 4. Böbrek tetrasiklin düzeyleri.
(Kidney tetracycline levels).



Resim 5. Karaciğer tetrasiklin düzeyleri.
(Liver tetracycline levels).



Resim 6. Kırmızı kas ve beyaz kas tetrasiklin düzeyleri.
(Red muscle and white muscle tetracycline levels).



Grafik 1. Standart eğri
(Standard response lines of tetracycline and Oxytetracycline for agar well technique)

Tartışma ve Sonuç

Bazı araştırmacılar (1, 11, 13) oksitetrasiklin ve tetrasiklin kalıntılarının mikrobiyolojik yöntem ile tayininde *Bacillus cereus*'un diğer test suşlarına göre daha duyarlı olduğunu bildirmektedirler.

Mikrobiyolojik yöntem ile yapılan bu metodun duyarlılık sınırının oksitetrasiklin için 10 ng olduğu tesbit edildi (Grafik 1, Resim 1, 2). Bu sonuçlar yukarıdaki araştırmacıların bulgularını destekler niteliktedir.

Oksitetrasiklin verilen grupta, sadece 2.5 saatte alınan böbrek numunelerinde ilaç kalıntısı tesbit edilebildi (Tablo 1, Resim 3). Buna karşılık tetrasiklin verilen grupta ise, plazma hariç, tüm dokularda ilaç kalıntısı tesbit edildi (Tablo 2, Resim 4, 5, 6). Her iki tetrasiklin grubu ilaç arasındaki kalıntı farklılığının, tetrasiklin (50 mg/kg)'in oksitetrasiklin (20 mg/kg)'e göre fazla miktarda verilmesine ve test suşunun, tetrasikline daha duyarlı olmasından kaynaklandığı sanılmaktadır.

Sonuç olarak, dokulardan tetrasiklin ve oksitetrasiklin kalıntılarının tesbitinde mikrobiyolojik yöntemin kullanılabilmesi gösterilmiştir. Ancak bu yöntemin daha duyarlı hale getirilmesi için dokuların uygun bir solvent ile ekstraksiyona tabi tutulduktan sonra, tesbit çalışmalarının yapılmasının daha iyi sonuçlar vereceği görüşüne varılmıştır.

Kaynaklar

1. Arret, B., Johnson, D. P. and Kırshbaum, A. (1971). Outline of Details for Microbiological Assays of Antibiotics: Second Revision. J. Pharmaceutical Science., 60 (11): 1989 - 1994.
2. Black, W. D. and Gentry, R. D. (1984). The Distribution of Oxytetracycline in the Tissues of Swine Following a Single Oral Dose. Can. Vet. J., 25: 158 - 161.
3. Booth, N. H., Mc Donald, L. E. (1982). «Veterinary Pharmacology and Therapeutics» 5. ed., The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
4. Haaland, M. A., Manspeaker, J. E. and Moreland, T. W. (1984). Antibiotic residues in milk after intrauterine infusion. Vet. Med., 382-386.
5. Johnston, R. W., Reamer, R. H., Harris, E. W., Fugate, H. G. and Schwab, B. (1981). A New Screening Method for the Detection of Antibiotic Residues in Meat and Poultry Tissues. J. Food. Protection., 44: 828 - 831.
6. Katz, J. M. and Katz, S. E. (1984). Rapid Assay for Tetracycline in Premixes and Mixed Feeds. J.A.O.A.C., 67 (3): 576 - 579.
7. Korkeala, H., Sorvettula, O., Mäki-Petäys, O. and Hirn, J. (1982). Comparison of Different Agar Diffusion Methods for the Detection of Antimicrobial Residues in Slaughter Animals. Acta Vet. Scand., 23: 407 - 415.
8. Nouws, J. F. M. (1984). Irritation, Bioavailability and Residue Aspects of Ten Oxytetracycline Formulations Administered Intramuscularly to Pigs. The Veterinary Quarterly., 6 (2): 80 - 84.
9. Nouws, J. F. M. and König, C. D. W. (1983). Penetration of Some Antibiotics into the Lacrimal Fluid of Sheep. The Veterinary Quarterly., 5 (3): 114 - 121.
10. Ouderkirk, L. A. (1976). Evaluation of Two Microbiological Methods for Detecting Residual Antibiotics in Milk. J.A.O.A.C., 59: 1122-1124.

11. Schachter, S., Bankowski, R. A., Sung, M. L., Miers, L. and Strassburger, M. (1984). Measurement of Tetracycline Levels in Parakeets. Avian Diseases., 28 (1): 295 - 302.
12. Thorpe, U. A. (1975). Agar Well Technique for Antibiotics in Animal Feeds. J.A.O.A.C., 58 (1): 95 - 98.
13. Zıv, G. (1982). Serum Oxytetracycline Concentration in Cows and Calves After Intramuscular injection of Conventional and Two Long Acting Oxytetracycline Preparations. Refuah Veterinarith., 39 (4): 154 - 160.

