

Gıdalarda Antibiyotik Kalıntılarının Saptanması için Enzim İmmunoassay Geliştirilmesi

Ulaş ACARÖZ¹, Damla ARSLAN-ACARÖZ^{2*}, Zeki GÜRLER¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Afyonkarahisar/TÜRKİYE

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Afyonkarahisar/TÜRKİYE

Corresponding author e-mail: damlaarslan06@hotmail.com

ÖZ

Veteriner hekimlikte tedavi ve koruyucu amaçla çok sayıda farmakolojik madde kullanılmaktadır. En yaygın ve bilinçsiz kullanılanların başında ise antibiyotikler yer almaktadır. Antibiyotikler, hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamalarına rağmen yanlış kullanımına bağlı olarak et, süt, yumurta, bal gibi hayvansal kökenli gıdalarda kalıntı sorununa neden olmaktadır. Antibiyotik kalıntısı içeren gıdalar halk sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır. Halk sağlığını koruma amacıyla, Avrupa Birliği hayvansal kökenli gıdalarda farmakolojik aktif maddeler için maksimum kalıntı limitleri belirlemiştir. Günümüzde gıdalarda antibiyotik kalıntılarının tespiti için geliştirilmiş mikrobiyal inhibisyon testleri, immunoassayler ve kromatografik metotlar mevcuttur. Enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) metodu laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmakta, güvenilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede çok sayıda örnekle çalışma imkanı sunmaktadır. Bu metodun geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken en önemli aşama immunojenin sentezidir. Antibiyotikler küçük moleküler ağırlığa sahip olduğundan genellikle immün yanıt oluşturmazlar. İmmün yanıt oluşturabilmek için antibiyotik yeterli büyüklükte bir proteine bağlanarak immunojen elde edilir. Antibiyotüğün proteine bağlanması çoğunlukla karbodiimid, glutaraldehyd ve aktif ester gibi metotlar ile gerçekleştirilir. Hangi metodun kullanılacağı ilgili antibiyotüğün kimyasal yapısına bağlıdır. Sentezlenen immunojen ile deney hayvanları immunize edilerek, spesifik antikorlar elde edilir. Daha sonra metot optimize edilerek çeşitli gıda maddeleri için geliştirilir.

Anahtar Kelimeler: Hayvansal Kökenli Gıdalar, Antibiyotik Kalıntısı, Enzim-Linked İmmunosorbent Assay, Metot Geliştirme.

Enzyme Immunoassay Development for the Detection of Antibiotic Residues in Foods

ABSTRACT

In veterinary medicine, a large number of pharmacological agents are used for prophylactic purpose and treatment. Antibiotics are in the first place among most commonly and inappropriately used pharmacological agents. Although antibiotics play a crucial role in the treatment of the illnesses, misuse of them causes residue problem in the food of animal origin such as milk, eggs, meat, and honey. The food containing antibiotic residues endanger public health. To protect the public health, maximum residue limits for pharmacologically active substances in foods of animal origin have been established by the European Union. To detect the antibiotic residue in foodstuff, several methods such as microbial inhibition tests, immunoassays and chromatographic methods have been established. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method is widely used in a laboratory gives reliable results and offers to work with a large number of samples in a short time. The most important step in the development of this method is the immunogen synthesis. Antibiotics are generally not able to stimulate the immune response because of their low molecular weight. To stimulate the immune response, the immunogen is synthesized by conjugating antibiotics to a protein of sufficient size. The conjugation of antibiotic to protein is mostly performed using some methods such as carbodiimide, glutaraldehyde, and the active ester. Conjugation method is chosen depending on the chemical structure of used antibiotics. Specific antibodies are generated by immunizing the experimental animals with the obtained immunogen. Then, methods are optimized and developed for various foodstuff.

Key Words: Foods of animal origin, Antibiotic residue, Enzyme-linked immunosorbent assay, Method development.

To cite this article: **Acaröz U, Arslan-Acaröz D, Gürler Z.** Gıdalarda Antibiyotik Kalıntılarının Saptanması için Enzim İmmunoassay Geliştirilmesi. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(2):122-126.

GİRİŞ

Dünyanın pek çok ülkesinde olduğu gibi Türkiye’de de antibiyotikler yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Dünyada yıllık 100.000-200.000 ton antibiyotik üretildiği tahmin edilmektedir ve bunun büyük bir kısmı tarım, balıkçılık ve veteriner hekimlik alanında kullanılmaktadır (Laxminarayan ve ark 2013, Howard ve ark 2013, Pullukçu 2013, Aalipour ve ark 2014). Bilinçsiz antibiyotik kullanımı ve kalıntı arınma süresine dikkat edilmemesi sonucunda hayvansal kökenli gıdalarda antibiyotik kalıntısı bulunmaktadır (Yüksek 2001). Gıdalardaki antibiyotik kalıntıları insan sağlığını doğrudan ve dolaylı olarak etkilemektedir. Hassasiyete sahip bireylerde antibiyotikler doğrudan alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir (Reig ve Toldrá 2011, Lim ve ark 2013). Dolaylı etkiye ise günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunu olan antibiyotik direncini örnek verebiliriz. Bu durum hem hastalıkların tedavisinde güçlükler ortaya çıkarmakta hem de fermente ürün teknolojisinde starter kültürleri etkileyerek ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Wise ve ark 1998, Reig ve Toldrá 2011, Zheng ve ark 2013). Gıdalardaki antibakteriyel maddelerin saptanması için birçok ülkede kontrol programları oluşturmuştur ve Avrupa Birliği tüketicilerin gıda güvenliğini sağlamak amacıyla hayvansal kökenli gıdalarda antibakteriyel maddelerin maksimum kalıntı limitlerini belirlemiştir (Bittencourt ve ark 2012, EC. No. 37/2010). Gıdalardaki antibiyotik kalıntı kontrolü immunolojik, mikrobiyolojik ve kromatografik metotlar ile gerçekleştirilir. Mikrobiyolojik metotlar ucuz olmalarına karşın uzun inkübasyon süresine ihtiyaç duyarlar, belirlenmek istenen maddeye spesifik değildirler ve hassasiyetleri zaman zaman yasal olarak belirlenen maksimum kalıntı limitleri için yeterli değildir. Kromatografik metotlar kalıntı maddelerini spesifik olarak ve yüksek hassasiyet ile saptayabilirler ancak pahalı olmaları, kalifiye teknik eleman gerektirmeleri nedeniyle daha çok doğrulama metodu olarak kullanılmaktadır (Le ve ark 2011, Galarini ve ark 2014, Wang ve ark 2015).

İmmunolojik Metotlar

İmmunolojik metotlar (immunoassayler) antijen-antikor reaksiyonlarına dayalı yöntemler olup, bu metotlarda antijen-antikor bağlanması çeşitli indikatörler ile görünür hale getirilir. İlk olarak 1950’li yıllarda radyo aktif izotopların kullanıldığı radioimmunoassayler (RIA) geliştirilmiştir (Bremus 2012). RIA ile endojen plazma insülin düzeyini ölçen Yalow 1977’de Nobel ödülü almıştır. Radyo aktivite kaynaklı güvenlik sorunlarında ötürü radyo aktif izotopların enzimle yer değiştirilmesi sonucu RIA modifiye edilerek enzim immunoassayler (EIA) geliştirilmiştir (Gan ve Patel 2013). Geliştirilen EIA metodu ise renk reaksiyonu temellidir. Bu renk, horseradish peroksidaz (HRP) gibi çeşitli enzimlerin

kendilerine özgü substratları katalize etmesi sonucu oluşmaktadır (Engvall ve Perlmann 1971, Bremus 2012). Diğer bir deyişle, bu yöntemde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. Antijen-antikor reaksiyonuna dayanan birçok metot olmasına rağmen son yıllarda en çok kullanılan Enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) testidir (Uçan ve ark 2010a; Uçan ve ark 2010b). ELISA farklı kriterlere göre sınıflandırılabilir, ancak antibiyotik gibi küçük moleküler ağırlıklı maddeler tek bir bağlanma noktasına sahip oldukları için sadece kompetitif sistemler ile saptanabilir. Kompetitif sistemlerde saptanacak olan serbest antijen ile işaretli antijen sınırlı sayıdaki antikor için yarışır. Kompetitif sistem kendi içinde doğrudan (direkt) ve dolaylı (indirekt) olarak ikiye ayrılır. Doğrudan metotta spesifik antikorlar doğrudan ya da ikincil antikorlar aracılığı ile taşıyıcı materyale bağlanır. Serbest ve enzime bağlı antijen, antikor yüzeyindeki boş olan antikor bağlanma noktaları için rekabet ederler. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, bağlanmamış olan maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Bu işlemde sonra enzime spesifik substrat eklenir. Bu substrat enzim tarafından serbest antijen miktarına ters orantılı olacak şekilde katalize edilir. Dolaylı metotta ise proteine bağlı olan antijen taşıyıcı yüzeye bağlanır ve bu antijen ile serbest antijen, serbest haldeki antikoron sınırlı bağlanma noktaları için yarışır. Daha sonra, bağlanmış olan spesifik antikoru saptayabilmek için enzime bağlı olan türe özgü ikincil antikor eklenir ve inkübe edilir. Yıkama aşamasından sonra, enzim spesifik substrat eklenir ve yukarıda belirtildiği gibi reaksiyondaki serbest antijen miktarına ters orantılı olarak renk değişimi gözlenir (Tijssen 1985, Märtilbauer 1993, Acaröz 2015).

Diğer bir yönden bu sistemler homolog ve heterolog olarak gruplandırılır. Homolog sistemlerde hem immunojen hem de antijen-konjugatları aynı haptene ve bağlama metodu ile sentezlenir. Heterolog sistemler de kendi içinde farklı gruplara ayrılabilir. Örneğin haptene heterolojisinde, hedef haptene benzer fakat farklı bir antijen kullanılır, köprü heterolojisinde immunojenin sentezlenmesinde kullanılan farklı bir bağlama ajanı kullanılır, ya da yan heterolojide haptene molekülünün farklı kısımlarından konjugasyon yapılır. Heterolog sistemlerde, hassasiyet kullanılan antikoron affinitesine bağlı olarak yükseltilebilir (Van Weemen ve Schuur 1975, Tijssen 1985).

Metodun geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken hususlar

Mikotoksin, pestisid ve antibiyotik gibi düşük moleküler ağırlığa sahip bileşikler genellikle immun yanıt oluşturmazlar. Bu tür bileşiklere karşı antikor üretilebilmesi için bağışıklık sistemini uyarabilme yeteneğine sahip, yüksek moleküler ağırlıklı bir

proteine kovalent bağlanarak immunojen sentezi gerçekleştirilir (Spinks ve ark 1999, Thirumala-Devi ve ark 2002, Kim ve ark 2003, Strasser ve ark 2003). Antibiyotiklere karşı immunojen sentezinde, antibiyotiklerin üzerindeki fonksiyonel grupların varlığı çok önemlidir. Zira bazı antibiyotiklerin üzerindeki fonksiyonel gruplar sayesinde direkt olarak proteine bağlama işlemi yapılabilirken (Chen ve ark 2008), bazı antibiyotiklerde ise bağlama işleminden önce derivatizasyon işleminin uygulanması gerekir (Campbell ve ark 1984). Hatta grup spesifik antikor üretebilmek amacıyla kimyasal olarak yeni bir hapten sentezine ihtiyaç duyulabilir (Pinacho ve ark 2012). ELISA sisteminin oluşturulabilmesi ve optimizasyonu için immunojenin yanı sıra protein konjugatlarının da sentezlenmesi gerekmektedir. Hem immunojen hem de protein konjugatları çeşitli konjugasyon metodlarıyla sentezlenir. En yaygın kullanılanları karbodiimid, glutaraldehid, aktif ester ve anhidrit metodlarıdır (Wang ve ark 2007, Chen ve ark 2008). Üretilen immunojen ile poliklonal ya da monoklonal antikor sentezlemek için deney hayvanları immunize edilir. Elde edilen poliklonal ve monoklonal antikorlar ELISA metodunun geliştirilmesinde kullanılır. Her iki antikorun da avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Poliklonal antikorların üretilmesi monoklonal antikorlara göre daha kısa süre, daha az maliyet ve daha az teknik beceri gerektirmektedir. Poliklonal antikorların en önemli problemi ise elde edilen miktarının sınırlı olmasıdır. Zira aynı immunojen ile immunize edilen hayvanların ürettikleri antikorların hassasiyeti ve spesifitesi farklıdır. Yani bir poliklonal antikor tükendiğinde aynı şartlar altında tekrar üretilmeye çalışılsa bile aynı özelliklere sahip olmaz. Monoklonal antikorlar ise sınırsız miktarda ve homojen olarak üretilebilir (Ritter 2000, Lipman ve ark 2005). Antikorların elde edilmesinden sonra, metot optimize edilir ve çeşitli gıdalar için geliştirilir. Gıdaların bileşenleri antijen-antikor reaksiyonlarını olumsuz etkileyebilir, ancak ELISA metodu ile gıdalardaki kalıntı analizinin yapılabilmesi için genellikle basit bir ekstraksiyon aşaması yeterli olmaktadır. Örneğin sütte santirifüj işlemi ve metot solüsyonunun da seyreltme yeterli olabilmektedir. Et örnekleri fosfat tampon solüsyonu veya fosfat tampon solüsyonu/metanol gibi karışımlar ile homojenize edilir, santrifüj işleminden sonra elde edilen ekstrakt seyreltilerek ilgili ELISA'da kullanılır. Metot geliştirilirken ilgili gıda maddesi yapay olarak antibiyotik ile kontamine edilir ve yukarıda belirtildiği gibi bir ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra geri kazanım değeri belirlenerek metot geliştirilmiş olur (Burkin ve Galvidis 2010, Huet ve ark 2006, Suryoprabowo ve ark 2014, Acaröz 2015).

SONUÇ

Hastalıkların tedavisinde bilinçsiz antibiyotik kullanılması ve yasal bekleme sürelerine uyulmaması

sonucunda hayvansal kökenli gıdalardaki antibiyotik kalıntı problemi ile karşı karşıya kalmaktayız. Bu problem halk sağlığı açısından tehlike arz etmektedir. Avrupa Birliği, tüketicileri korumak amacıyla farmakolojik aktif maddelerin gıdalardaki kalıntı miktarları ile ilgili yasal düzenleme yaparak maksimum kalıntı limitleri belirlemiştir. Yasal kontrollerinin yapılabilmesi için çeşitli metotlar mevcuttur. ELISA, antibiyotik kalıntılarının gıdalardaki tespiti için kolay uygulanabilen, yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip olan bir metottur. Aynı zamanda, kısa sürede çok sayıda örneğin incelenmesine olanak sağladığından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Aalipour F, Mirlohi M, Jalali, M.** Determination of antibiotic consumption index for animal originated foods produced in animal husbandry in Iran, 2010. *J Environ Health Sci and Eng.* 2014; 12(1): 42.
- Acaröz U.** Entwicklung und Anwendung von generischen monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika in Lebensmitteln. Doctoral Dissertation, Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2015.
- Bittencourt MS, Martins MT, de Albuquerque FG, Barreto F, Hoff R.** High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2012; 29(4): 508-516.
- Bremus AC.** Optimierung und Evaluierung von Enzymimmuntests zum Nachweis von Cephalosporin-Antibiotika in Milch. Doctoral Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2012.
- Burkin MA, Galvidis IA.** Development of a competitive indirect ELISA for the determination of lincomycin in milk, eggs, and honey. *Journal Agr And Food Chem.* 2010; 58(18): 9893-9898.
- Campbell GS, Mageau RP, Schwab B, Johnston RW.** Detection and quantitation of chloramphenicol by competitive enzyme-linked immunoassay. *Antimicrob Agents And Chemother.* 1984; 25(2): 205-211.
- Chen Y, Wang Z, Wang Z, Tang S, Zhu Y, Xiao X.** Rapid enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for kanamycin and tobramycin in swine tissues. *J Agri Food Chem.* 2008; 56(9): 2944-2952.
- EC.** Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in

- foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Communities*. 2010; L 15: 1–72.
- Engvall E, Perlmann P.** Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin antigen-coated tubes. *J Immunol*. 1971; 109: 129-135.
- Galarini R, Diana F, Moretti S, Puppini B, Saluti G, Persic L.** Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed. *Food Control*. 2014; 35(1): 300-310.
- Gan SD, Patel KR.** Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*. 2013; 133(9): e12.
- Howard SJ, Catchpole M, Watson J, Davies SC.** Antibiotic resistance: global response needed. *The Lancet Infect Dis*. 2013; 13(12): 1001-1003.
- Huet AC, Charlier C, Tittlemier SA, Singh G, Benrejeb S, Delahaut P.** Simultaneous determination of (fluoro) quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Agri Food Chem*. 2006; 54(8): 2822-2827.
- Kim YJ, Cho YA, Lee HS, Lee YT, Gee SJ, Hammock BD.** Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity. *Analytica Chimica Acta*. 2003; 475(1): 85-96.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So A, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R.** Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infect Dis*. 2013; 13(12): 1057-1098.
- Le T, Yi SH, Zhao ZW, Wei W.** Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for the detection of chlortetracycline residues in edible animal tissues. *Food Addit Contam Part B*. 2011; 28(11): 1516-1523.
- Lim WS, Kim DH, Jin SY, Choi YS, Lee SH, Huh HJ, Chae SL, Lee Y.** A case of fixed drug eruption due to doxycycline and erythromycin present in food. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013; 5(5): 337-339.
- Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garci F.** Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal*. 2005; 46(3): 258-268.
- Märtlbauer E.** Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe. Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1993.
- Pinacho DG, Sanchez-Baeza F, Marco MP.** Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics. *Anal Chem*. 2012; 84(10): 4527-4534.
- Pullukçu H.** Toplum Kökenli İnfeksiyonlarda Olgularla Akılcı Antibiyotik Kullanımı. *ANKEM Derg*. 2013; 27(2): 111-112.
- Reig M, Toldrá F.** Patents for ELISA tests to detect antibiotic residues in foods of animal origin. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2011; 3(2): 110-114.
- Ritter MA.** Polyclonal and monoclonal antibodies. In *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*. Humana Press. 2000; pp. 23-34.
- Spinks CA, Wyatt GM, Lee HA, Morgan MRA.** Molecular modeling of hapten structure and relevance to broad specificity immunoassay of sulfonamide antibiotics. *Bioconjugate chemistry*, 1999; 10(4): 583-588.
- Strasser A, Usleber E, Schneider E, Dietrich R, Bürk C, Märtlbauer E.** Improved enzyme immunoassay for group-specific determination of penicillins in milk. *Food and agricultural immunology*. 2003; 15(2): 135-143.
- Suryoprabowo S, Liu L, Peng J, Kuang H, Xu C.** Development of a Broad Specific Monoclonal Antibody for Fluoroquinolone Analysis. *Food Analytical Methods*. 2014; 7(10): 2163-2168.
- Thirumala-Devi K, Mayo MA, Hall AJ, Craufurd PQ, Wheeler TR, Waliyar F, Subrahmanyam A, Reddy DVR.** Development and application of an indirect competitive enzyme-linked immunoassay for aflatoxin M1 in milk and milk-based confectionery. *J Agri Food Chem*. 2002; 50(4): 933-937.
- Tijssen P.** Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier, Amsterdam, Holland, 1985.
- Uçan US, Aras Z, Zorlutuna M.** Detection of canine brucellosis by a rapid agglutination test using *Rhizobium tropici* as antigen. *Revue Med Vet*. 2010a; 161: 51-56.
- Uçan US, Aras Z, Semacan A.** Serodiagnosis of *Brucella canis* infection in dogs by a dipstick enzyme immunoassay. *Eurasian J Vet Sci*. 2010b; 26(2): 109-112.
- Van Weemen BK, Schuur A.** The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on characteristics of estrogen enzymeimmunoassays. *Immunochemistry* 1975; 12: 667-670.
- Wang Z, Zhu Y, Ding S, He F, Beier RC, Li J, Jiang H, Feng C, Wan Y, Zhang S, Kai Z,**

- Yang X, Shen J.** Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds *Anal Chem.* 2007; 79(12): 4471-4483.
- Wang Z, Mi T, Beier RC, Zhang H, Sheng Y, Shi W, Zhang S, Shen J.** Hapten synthesis, monoclonal antibody production and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for erythromycin in milk. *Food Chem.* 2015; 171: 98-107.
- Wise R, Hart T, Cars O, Streulens M, Helmuth R, Huovinen P, Sprenger M.** Antimicrobial resistance: Is a major threat to public health. *BMJ: British Med J.* 1998; 317(7159): 609-610.
- Yüksek N.** Etilerde antibiyotik kalıntılarının aranması üzerinde çalışmalar. *J Fac Vet Med.* 2001; 20: 85-90.
- Zheng N, Wang J, Han R, Xu X, Zhen Y, Qu X, Sun P, Li S, Yu Z.** Occurrence of several main antibiotic residues in raw milk in 10 provinces of China. *Food Addit Contam Part B.* 2013; 6(2): 84-89.