

Ticari Bir Florfenikol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Test Kiti ile Florfenikolün Tespit Edilememesi Durumu

Yasemin Coşkun, Özlem Kafa, Yasemin Koçyiğit, Ahmet Turan Erdoğan

İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Toksikoloji Bölümü, İZMİR

Geliş Tarihi /Received:07.11.2014, Kabul Tarihi/Accepted: 03.03.2015

Özet: Gıda ve yemlerde bulunan antibiyotik kalıntıları tüketiciler için bazı sorunlara, antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına ve gıda endüstrisinde kalite düşüklüğüne neden olmaktadır. Gıda kalitesini ve tüketici sağlığını korumak için Türkiye ve Avrupa Birliği ülkeleri hayvan kökenli gıdalarda azami kalıntı seviyesini belirleyen yönetmelikler hazırlamıştır. Hayvan kökenli gıdalarda ve yemlerde antibiyotik kalıntılarının izlenmesinde farklı tarama ve tarama sonrası doğrulama yöntemi sırası izlenmektedir. Bu çalışma, ticari bir florfenikol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) test kitinin florfenikolü tespit edememesinin sebebini ortaya koymak amacıyla yapıldı. Kit muhteviyatında bulunan standartların florfenikol olmadığı kloramfenikol olduğu sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometresi (LC-MS/MS) metodu ile tespit edildi. Kit muhteviyatının kloramfenikol ELISA metoduna göre yapılan analizinde anlamlı ışık yoğunluğu değeri ölçüldü. Yapılan analizler sonucunda ticari florfenikol ELISA test kitinin florfenikol test kiti olmadığı, kloramfenikol test kiti olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: ELISA, florfenikol, kloramfenikol, LC-MS/MS

Case of not Detecting Florfenicol by A Commercial Florfenicol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Test Kit

Abstract: The presence of antibiotic residues in food and feed can cause some problems for consumers or occurrence of antibiotic resistance and leads to low quality in the food industry. To protect the food quality and consumer health, Turkey and European Union implemented regulations governing maximum residue levels in certain animal origin food products. Various screening and post-screening for confirmation methods followed in monitoring the antibiotic residues in animal origin food and feed. This study was performed to determine the reason for a commercial florfenicol Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) test kit not detecting florfenicol. With the Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) method, the kit standards were found not to be florfenicol but chloramphenicol. Significant absorbance value was measured at the analysis of the kit content according to chloramphenicol ELISA method. As a result of the analysis, it has been concluded that the commercial florfenicol ELISA test kit was not a florfenicol test kit, but a chloramphenicol test kit.

Key words: Chloramphenicol, ELISA, florfenicol, LC-MS/MS

Giriş

Hızla artan dünya nüfusunun yeterli ve dengeli bir şekilde beslenebilmesi için gerekli hayvansal gıda maddelerinin ucuz ve bolca üretilebilmesi bütün ülkelerin gündeminde olan önemli konulardan biridir [14]. Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi, gelişmenin hızlandırılması ve yemden yararlanmanın artırılması, paraziter hastalıkların kontrolü ve beslenmenin desteklenmesi amacıyla çok sayıda ilaç, hormon, vitamin ve mineral madde kullanılmaktadır [10]. Gıda değeri olan hayvanlarda, yasaklanmış veya tüketimine yasal olarak müsaade edilmiş antibakteriyel ilaçların, bilinçsizce ve suiistimal derecesinde kullanımı sonucunda halk

sağlığı açısından ciddi sakıncalar oluşturabileceği anlaşılmıştır. Özellikle gıda değeri olan hayvanlarda ilaç kullanımı söz konusu olduğu sürece et, süt, yumurta, bal gibi gıdalarda ilaç kalıntılarının bulunmasının önemi güncelliğini koruyacaktır [11].

Gıdalardaki ilaç ve kimyasal madde kalıntılarını ve düzeylerini ortaya koymak için son derece duyarlı, güvenilir ve tekrarlanabilir analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Birçok ülke veya Dünya Sağlık Örgütü, Gıda ve Tarım Örgütü, Avrupa Birliği, Amerika Besin ve İlaç İdaresi, ülkemizde Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı gibi önemli kuruluşlar, tüketici sağlığını korumak amacıyla çok yönlü çalışmalar yapmaktadır. İlaç

kalıntılarının yol açabilecekleri ekonomik ve sosyal yönlü olumsuzlukların önlenmesi amacıyla, bir yandan veteriner ilaçların kullanımında etkin bir kontrol sağlanırken bir yandan da birçok ülkede aynı konularda sürdürülen çalışma ve uygulamalar arasında birlik ve uyumun düzenlenmesine çalışılmaktadır [11].

Hayvan kökenli gıdalarda antibiyotik kalıntılarının izlenmesinde sıklıkla yüksek verimli bir tarama ve tarama sonrası doğrulama yöntemi sırası izlenmektedir [9]. Tarama analizleri bir analit veya analit sınıfının varlığını 2002-657 sayılı Avrupa Birliği Kararında belirtilen seviyelere uygun olarak tespit etmek için kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler çok numune akışının olduğu laboratuvarlarda olası uyumsuz sonucu olan numuneleri elemek için kullanılır. Bu seviyeler azami kalıntı limiti (Maximum Residue Limits, MRL) ya da minimum gerekli performans limiti (Minimum Required Performance Limit, MRPL) gibi düzenleme seviyeleri ya da uygulama seviyesidir. Tarama analiz metotları kalitatif ya da yarı kantitatif metotlardır. Tarama analizleri biyolojik, biyokimyasal ve fizikokimyasal yöntemlerle belirleme yapmaktadır [1,7]. Antibiyotik kalıntılarının belirlenmesinde farklı tarama ve doğrulama analiz metotları kullanılmaktadır. Kullanılan tarama metotları ile kısa zamanda çok sayıda numune antibiyotik kalıntısı yönünden analiz edilmektedir [8].

Antibiyotik kalıntılarının izlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem mikrobiyolojik inhibisyon test yöntemidir. Bu metotları gerçekleştirmek kolay ve ucuz ancak özgüllüğü eksiktir. Herhangi bir antibiyotik olmasa bile inhibisyon oluşabilir. Tarama metotlarının diğer bir olumsuzluğu ise kullanılan antikor, bakteri veya reseptörün bir veya çok az bir antibiyotik grubunu algılayabilmesidir. Bu durum tüm antibiyotik gruplarının izlenebilmesi için farklı antibiyotik gruplarına cevap veren mikrobiyolojik inhibisyon testlerinin ya da farklı tarama testlerinin bir arada kullanılmasını gerektirmektedir. Ayrıca tarama testinden elde edilen pozitif sonuç hangi antibiyotik grubu olduğunu belirtmemektedir. Birçok durumda tarama sonrası yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir [9].

Antijen antikor reaksiyonunu gerçekleştirmek için birçok yöntem olmasına rağmen son yıllarda en çok kullanılan yöntem ELISA testidir. Bu yöntemde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte

ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. ELISA testinin direkt, indirekt ve sandviç ELISA gibi farklı şekilleri olmasına rağmen en sık kullanılanı sandviç ELISA yöntemi- dir [5].

Genel olarak çalışmalarda tek bir antibiyotik grubunu hedef alarak geliştirilmiş metotlar bulunmaktadır. Test materyalinde tek özütleme işlemi ile çok sayıda antibakteriyel maddenin tespit edilmesi maliyet açısından önemlidir. Bu nedenle farklı gıda maddelerinde geniş bir yelpazede antibakteriyel ilaç kalıntılarına ait tarama analizleri için genel numune hazırlama işlemleri MRL ya da MRPL altında bir seviyede yapılmalıdır. Öte yandan, materyalden gelen etkiler nedeniyle değerlendirme bazen çok zorlaşır ve sorunlar yaşanır. Sıvı kromatografi kütle spektrometresi yöntemlerinde materyalden gelen etkileri ortadan kaldırmak için aynı materyal türünden negatif olduğu bilinen materyal üzerine standart eklemesi yapılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak ya da aynı antibiyotik grubunda bulunan ancak ilaç olarak kullanılmayan bir türevi iç standart olarak kullanılarak değerlendirme yapılır [12]. Sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometresi özgüllük ve duyarlılığı nedeniyle dünyada en çok kullanılan analitik cihazdır. Veteriner ilaç kalıntı analizlerinde bu tekniğin uygulanabilirliği ile ilgili kanıtlanmış birçok bilimsel makale bulunmaktadır [13].

Florfenikol, geniş spektrumlu sentetik bir antibakteriyel ilaçtır. Yapısal olarak kloramfenikole benzer ancak kloramfenikoldeki p-nitro grubu yerine metil sülfonil grubunun, hidroksil grubu yerine flor atomunun bulunması ile ondan ayrılır [2]. Florfenikol kalıntısı Ulusal Kalıntı İzleme Planı çerçevesinde kanatlı kas ve karaciğerinde, yetiştiricilik yoluyla elde edilen su ürünlerinde, yumurta ve kırmızı ette izlenmektedir [4]. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'ne göre izinli antibiyotiklerdendir, ancak sütü ve yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmamalıdır [3].

Bu çalışmada ticari bir florfenikol ELISA test kiti ile analizi yapılan florfenikol yönünden negatif olduğu bilinen numuneler ile negatif numunelerin üzerine analitik florfenikol standardı yüklemesi yapılarak hazırlanan yüklü numunelerin ELISA ile

analizi sonucu anlamlı ışık yoğunluğu değeri ölçülmemesi ve kit muhteviyatındaki standartlardan oluşturulan kalibrasyon eğrisinin kendi içerisinde anlamlı olmasından dolayı kit muhteviyatı standartlarının LC-MS/MS sisteminde analiz edilmesi sonucu standartların kloramfenikol olduğunun tespiti edildiği bir olgu bildirilmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmamızda materyal olarak kanatlı kas ve karaciğer dokusu numuneleri ve ticari bir florfenikol ELISA test kiti muhteviyatı kullanılmıştır.

Metot

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Florfenikol (Dr.Ehrenstorfer, 00623, %99,5 saflıkta), kloramfenikol (Dr.Ehrenstorfer, 90424, %98,5 saflıkta), kloramfenikol D5 (Dr.Ehrenstorfer, 10307AC, %98,6 saflıkta), analitik saflıkta etilasetat (Sigma Aldrich), n-hekzan (Sigma Aldrich), metanol (Sigma Aldrich), amonyum asetat (Carloerba).

Kullanılan Malzemeler

Santrifüj tüpü (50 ml, polipropilen), balon joje (10 ml, 25 ml, 50 ml ve 100 ml) cam tüp (10 ml, vida kapaklı), otomatik örnekleyici vialı (1,5 ml, amber renkli cam), RC filtre (0,45 µm göz açıklığında), otomatik pipet (1 ve 5 ml, Eppendorf), mikropipet (100 ve 1000 µl, Eppendorf).

Kullanılan Ekipman

Blender (Waring, 8011 ES), hassas terazi (1 mg hassasiyette, Sartorius, CP 423 S), hassas terazi (0.1 mg hassasiyette, Sartorius, TE 214 S), vorteks (Heidolph, Reax Top), çoklu vorteks (Heidolph, Multi Reax), soğutmalı santrifüj (Hettich, Rotina 35 R), çoklu uçurucu (Caliper, Turbo Vap LV), ELISA okuyucu (Bio-Tek, EL808), 6460 serisi sıralı kütle spektrometresi (Agilent), 1260 serisi sıvı kromatografisi (Agilent), 1260 serisi pompa (Agilent), 1260 serisi degazer (Agilent), 1260 serisi otomatik örnekleyici (Agilent), 3,5µ, 100 mm x 4,6 mm ebadında kolon (Zorbax SB-C18).

Florfenikol kit muhteviyatında 96 kuyucuk, 6 standart çözeltisi (0, 0.5, 1.5, 4.5, 13.5 ve 40.5 µg/kg), enzim konjugat (enzim ile işaretli antikor), yo-

ğunlaştırılmış antikor çalışma çözeltisi, substrat A ve B çözeltileri, testi durdurma çözeltisi, yoğunlaştırılmış yıkama çözeltisi, yoğunlaştırılmış çözücü çözelti bulunmaktadır.

Testin belirleme seviyesi: 0.5 ppb

Geri Kazanım: Doku % 80±18, bal % 70±14

Çapraz Etkileşme Oranı: Florfenikol % 100, florfenikol amin % 11, tiamfenikol < % 0.1, kloramfenikol < % 0.1.

Test Numunesinden Florfenikolün Özütlenmesi: Numuneden 50 ml'lik santrifüj tüpüne 3,0 ± 0,1 g tartıldı. Üzerine 3ml saf su ardından 6 ml etil asetat eklenerek önce tekli vortekste kuvvetlice 10-15 saniye daha sonra 10 dakika çoklu vortekste karıştırıldı ve 10 dakika 20 °C de 4000 rpm'de santrifüj edildi. Üst fazdan 2 ml cam tüpe alındı ve evaporatörde 50 °C'de azot gazı ile kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kurumuş olan özütün üzerine 3 ml n-hekzan eklenerek 10-15 saniye vorteks yardımı ile çözünmesi sağlandı. Üzerine 1 ml çözücü çözelti eklendi ve 10 dakika çoklu vortekste karıştırıldı. Ardından 10 dakika 20 °C de 4000 rpm'de santrifüj edildi. Alt fazdan 0,5 ml mikropipet ile alındı ve 0,45 nm göz açıklığındaki filtreden süzülerek 10 ml hacimli cam tüplere alındı.

Florfenikol Kontrol Kas ve Karaciğer Doku Numunelerinin Özütlenmesi: Daha önceden laboratuvarımızda analiz edilmiş ve içerisinde florfenikol bulunmayan kas ve karaciğer dokuları kontrol doku numunesi olarak kullanıldı. Homojenize edilmiş kontrol kas doku numunesinden bir santrifüj tüpüne numune ile aynı miktarda tartıldı. Özütleme işlemleri numuneye uygulandığı şekli ile aynen tekrarlandı.

Florfenikol Standardı Yüklenmiş Kas ve Karaciğer Doku Numunesinin Özütlenmesi: Homojenize edilmiş kontrol kas ve karaciğer doku numunesinden bir santrifüj tüpüne numune ile aynı miktarda tartıldı. İçerisinde 3 gram numune bulunan her tüpe, yoğunluğu 3 µg/ml derişiminde analitik florfenikol standardından 75 µl ilave edilerek 75 µg/kg florfenikol içeren yüklü numuneler hazırlandı. Özütleme işlemleri numuneye uygulandığı şekli ile aynen tekrarlandı.

Florfenikol ELISA Uygulaması: Kit içerisindeki kuyucuk ve tüm solüsyonlar analiz öncesinde, karanlık ortamda oda sıcaklığına gelinceye kadar

bekletildi. Kullanılacak standart ve numune sayıları düşünülerek gerekli sayıda kuyucuk başka bir kuyucuk taşıyıcıya alındı. Kuyucuk taşıyıcı yerleşim planı; standart çözeltileri, kontrol kas ve karaciğer doku numuneleri, standart yüklenmiş kas ve karaciğer doku numuneleri şeklinde hazırlandı. Günlük laboratuvar çalışmalarında standart 1 ve standart 6 kullanıldı. Kuyucuklara yerleşim planına uygun olarak standart ve numunelerden 50 ml eklendi. Kuyucuklara 50'şer ml seyreltilmiş antikor ilave edildi. Kuyucuk taşıyıcı el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırıldı. Kuyucuk taşıyıcı, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 1 saat tepkimenin oluşması için bekletildi. Bekleme süresi biten kuyucuk taşıyıcı hızlıca ters çevrilerek içerik döküldü. Oda sıcaklığına gelmiş yıkama çözeltilisinden her bir kuyucuğa 250 ml olacak şekilde çoklu mikropipet yardımı ile eklendi, el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırıldı ve kuyucuk taşıyıcı hızlıca ters çevrilerek içerik döküldü. Yıkama işlemi 5 kez tekrar edildi. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100'er ml enzim konjugat çözeltilisinden ilave edildi. Kuyucuk taşıyıcı el ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırıldı. Kuyucuk taşıyıcı, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika tepkimenin oluşması için bekletildi. Bekleme süresi biten kuyucuk taşıyıcı hızlıca ters çevrilerek içerik döküldü. Yıkama işlemi 5 kez yapıldı. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 50'şer ml substrat A ve 50'şer ml substrat B çözeltilerinden sırasıyla ilave edildi. El ile dairesel hareketler yaptırılarak karıştırıldı. Kuyucuk taşıyıcı, karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika tepkimenin oluşması için bekletildi.

Bekleme sonrası her kuyucuğa 50 ml testi durdurma çözeltilisi ilave edildi ve dikkatlice karıştırıldı. Kuyucuk taşıyıcı, 5 dakika içerisinde ELISA okuyucuya yerleştirildi ve 450 nm dalga boyunda ışık yoğunluğu değeri okutuldu. Işık yoğunluğu değeri ile numunede bulunan florfenikol miktarı arasında negatif bağıntı bulunmaktadır.

Florfenikol ve kloramfenikol bileşiklerinin LC-MS/MS cihazı ile tespit edilmesinde Coşkun ve ark. [8]'nin bildirdiği metot kullanılmıştır. Numunelerin özütlemesi su ve etil asetat ile gerçekleştirildi. Santrifüj ile kaba parçacıklar çöktürüldü, üst faz alınarak kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kurumuş olan özüt su ve n-hekzan ile çözüldü, santrifüj edildi, alt faz filtreden geçirilerek LC-MS/MS sistemine enjekte edildi. Bu özütleme ile amfenikol türevi florfenikol, tiyamfenikol ve kloramfenikol bileşikleri tespit edildi.

Bulgular

Daha önceden laboratuvarımızda analiz edilerek içerisinde florfenikol bulunmayan kontrol kas ve karaciğer dokusu numuneleri ve üzerine analitik florfenikol standardı yüklenen numuneler ve florfenikol yönünden analiz edilmek üzere laboratuvara gelen numuneler kit içerisinde bildirilen yöntemle göre özütlendi, ELISA işlemi sırası uygulanarak ışık yoğunluğu değeri ELISA okuyucuda ölçüldü. Üzerine analitik florfenikol standardı yüklenen numuneler ile kontrol kas ve karaciğer dokusu numuneleri arasında ışık yoğunluğu değeri farkı olmadığı, kitin kendi standartları arasında fark olduğu görüldü (Tablo 1).

Tablo 1. Florfenikol kitine göre özütlenen ve ELISA işlemi uygulanan standart, kontrol kas doku ve standart yüklenmiş kas dokularından elde edilen ışık yoğunluğu değerleri.

Numunenin cinsi	Uygulama sayısı	İçindeki standart miktarı, µg/kg	ELISA okuyucuda okunan ışık yoğunluğu değeri	
			Uygulama 1	Uygulama 2
Standart 1	2	0	2.924	2.930
Standart 6	2	40.5	0.246	0.259
Laboratuarda hazırlanan florfenikol analitik standardı	2	40.5	2.257	2.177
Negatif tavuk eti numunesi	2	-	2.853	2.979
Standart yüklemesi yapılan tavuk eti numunesi	2	75	2.934	2.822
Negatif kanatlı karaciğer numunesi	2	-	2.948	2.664
Standart yüklemesi yapılan kanatlı karaciğer numunesi	2	75	2.726	2.635

Florfenikol yönünden negatif olduğu bilinen kanatlı kas ve karaciğer dokusu numuneleri ve analitik florfenikol standardı yüklenerek hazırlanan

numuneler LC-MS/MS cihazına verildi ve cihazda yükleme yapılan miktarda florfenikol tespit edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Kontrol doku ve standart yüklenerek hazırlanan doku numunelerinin LC-MS/MS cihazında çalışma sonuçları.

Numunenin cinsi	Uygulama sayısı	Negatif numune üzerine yüklenen analitik standart miktarı, µg/kg	Florfenikol	
			Alıkonulma zamanı, dakika	Miktarı, µg/kg
Negatif tavuk eti numunesi	1	-	-	-
Standart yüklemesi yapılan tavuk eti numunesi	2	50	3.358	50.7
Standart yüklemesi yapılan tavuk eti numunesi	1	100	3.363	99.7
Negatif kanatlı karaciğer numunesi	1	-	-	-
Standart yüklemesi yapılan kanatlı karaciğer numunesi	1	250	3.358	250.2
Standart yüklemesi yapılan kanatlı karaciğer numunesi	1	500	3.358	499.9

Kit içerisinde gelen ve florfenikol olduğu belirtilen standartlar LC-MS/MS cihazına verildi. Analitik florfenikol standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturularak kit standartları karşılaştırıldı. Florfenikol ile uyumlu sonuç bulunamadı; standartlar

tekrar cihaza verilerek amfenikol grubunda bulunan diğer bileşik olan kloramfenikol yönünden değerlendirildi ve standartların kloramfenikol olduğu tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 3. Florfenikol kit içeriğinde bulunan standartların LC-MS/MS cihazında çalışma sonuçları.

Standart türü	İçerisindeki standart miktarı, µg/kg	Florfenikol alıkonulma zamanı, dakika	Kloramfenikol alıkonulma zamanı, dakika	Kit Standardı alıkonulma zamanı, dakika
Analitik standart		3.348	3.795	
Kit Standardı 1	0			-
Kit Standardı 2	0.5			3.795
Kit Standardı 3	1.5			3.800
Kit Standardı 4	4.5			3.795
Kit Standardı 5	13.5			3.795
Kit Standardı 6	40.5			3.795

Kloramfenikol yönünden negatif olan numuneler üzerine kloramfenikol standardı yüklemesi yapılarak negatif ve standart yüklü numuneler aynı firmanın kloramfenikol kitinin özütlemeye yöntemine göre özütlendi, ELISA işlem sırası izlenerek nu-

munelerin ELISA okuyucuda ışık yoğunluğu değeri ölçüldü. Negatif numune ile standart yüklemesi yapılan numuneler arasında anlamlı ışık yoğunluğu değeri farkı tespit edildi (Tablo 4).

Tablo 4. Kloramfenikol kitine göre özütlenen ve ELISA işlemi uygulanan standart, kontrol kas doku ve standart yüklenmiş kas dokularından elde edilen ışık yoğunluğu değerleri.

	Uygulama sayısı	İçindeki standart miktarı, µg/kg	ELISA okuyucuda okunan ışık yoğunluğu değeri	
			Uygulama 1	Uygulama 2
Standart 1	1		1.369	-
Standart 2	1		1.068	-
Standart 3	1		0.880	-
Standart 4	1		0.470	-
Standart 5	1		0.247	-
Standart 6	1		0.141	-
Kloramfenikol yönünden negatif tavuk eti numunesi	2	-	1.701	1.617
Kloramfenikol standardı yüklenen tavuk eti numunesi	2	0.3	0.572	0.554
Kloramfenikol standardı yüklenen tavuk eti numunesi	2	0.6	0.389	0.388

Tartışma ve Sonuç

Besinlerde bulunan ilaç kalıntıları insanlarda hafif bir alerjiden başlayarak, çeşitli doku ve organlarda hasara ve anafilaktik şoktan ölüme kadar gidebilecek derecede değişik şiddette zehirlenmelere, karsinojenik ve farmakolojik etkilere, cinsiyet özellikleri ve davranışlarda değişikliklere, üreme bozukluklarına, bakteri, protozoa, parazit türleri arasında dirençli suşların ortaya çıkması ve böylece ilaçların sağaltıcı ve koruyucu etkilerinin azalmasına, gıda endüstrisinde üretim hatalarının ortaya çıkmasına ve sindirim kanalındaki mikroflora topluluğunda değişikliklere sebep olmaktadır [11].

Besinlerdeki ilaç kalıntılarında karşı tüketici sağlığının etkin biçimde korunabilmesi için her çeşit hayvansal besinde bulunacak ilaç kalıntısı çeşitleriyle kirlenme düzeylerinin sınırlandırılması son derece önem taşır [10]. Bu nedenle, hayvansal dokularda ve biyolojik sıvılarda antibiyotik analizlerinin yapılması giderek önem kazanmıştır [14]. Hayvansal besinlerin antibiyotik kalıntılarının arındırılabilmesi için uygulanması gereken yasal bekletme süresi, ilaçla tedavinin durdurulması ve besinlerde bulunmasına izin verilen kalıntı miktarlarının sınırlarının belirlenmesi amacıyla yapılan analizler, gıda güvenliği ve toplum sağlığı yönünden yapılan çalışmalara katkı sağlar [6].

Bir tarama yöntemi için temel koşul farmakolojik aktif maddeyi güvenli bir şekilde hedef yoğunlukta tespit etmek ve negatif sonuçları elemektir. Tarama analizlerinde eleme yoğunluğu numunedeki herhangi bir pozitifliği göstermesi açısından MRL karşılayacak şekilde düşük olmalıdır. Tarama hedef yoğunluğu ve düzenleme limiti arasındaki farkın yeterli olması gerekmektedir [7].

Çalışmamızda kullanılan florfenikol kitinin florfenikole cevap vermediği kit standartları, kontrol numuneleri ile analitik standart yüklenen numuneler arasında anlamlı ışık yoğunluğu farkı oluşmaması sonucu tespit edilmiştir. Kitin florfenikole cevap vermemesinin olası nedenleri; kitin üretim yerinden laboratuvara getirilirken ve/veya laboratuvarında uygun şartlarda muhafaza edilmemesi, yükleme yapılan analitik standardın etkinliğini kaybetmesi, analizi yapan personelin ELISA işlemi sırasında uyması gereken kurallara uymaması, kitin veya kit muhteviyatında bulunan bir maddenin son kullanma tarihinin geçmiş olması, kitin üretimi veya etiketlenmesi sırasında hata yapılmış olması olasılığıdır. Analiz sonuçları florfenikol yerine kloramfenikol konulduğunu gösterdiğinden bu tahminleri destekler niteliktedir.

Çalışmamızda florfenikol kitinin florfenikol özütleme yöntemine göre yapılan analizinde negatif numune ile yüklü numune arasında ışık yoğunluğu

farkı olmaması kitin florfenikole duyarlı olmadığını göstermektedir. Kitin kendi standartları ile ölçülen ışık yoğunluğu farkı ise kitin başka bir etkin maddeye karşı duyarlı olduğunu standartların bu etkin maddenin standartları olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu olgu raporu veteriner ilaç kalıntılarının tespiti amacıyla kullanılan tarama analiz kitlerinin aranılan etkin maddeye duyarlılığının belirlenmesi için içerisinde aranılan ilaç etkin maddesini içermeyen numune ve bu numune üzerine aranılan etkin maddenin yüklemesi ile hazırlanan numunenin aynı şartlarda özütlenmesinin yapılarak kitin çalışıp çalışmadığının belirlenmesi çok önemlidir. Laboratuvarında kullanılan tarama analiz kitlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin bilinmesi ve sonuçların buna göre değerlendirilmesi, ülkemizde kullanılan kitlerin Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından değerlendirilerek onay alan kitlerin kullanılmasının gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önemli olduğu ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

1. Anonim, (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002: implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Comm. L221:8-36.
2. Anonim, (2002). Florfenicol (Extension to all food producing species) Summary Report (6). Erişim adresi: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits-Report/2009/11/WC500014282.pdf, Erişim tarihi: 20.06.2014.
3. Anonim, (2012). Türk Gıda Kodeksi. Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitlerinin Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete, 04 Mayıs 2012, Sayı: 28282.
4. Anonim, (2014). Ulusal kalıntı izleme planı. Erişim adresi: <http://www.tarim.gov.tr/Konular/Gida-Ve-Yem-Hizmetleri/Gida-Hizmetleri/Kalinti-Izleme>, Erişim tarihi: 20.06.2014.
5. Aras Z, (2011). Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. Türk. Hij. Den. Biyol. Derg., 68 (2): 97-104.
6. Booth JM, Harding F, (1986). Testing for antibiotics residues in milk. Vet. Rec. Dec., 119 (23): 565-569.
7. Community Reference Laboratories Residues (CRLs) (2010). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Erişim adresi: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf, Erişim tarihi: 24.02.2011.
8. Coşkun Y, Erdoğan AT, Özdemir G, Uysaler R, Uludağ R, (2012). Tavuk Etinde Antibiyotik Kalıntılarının Sıvı Kromatografi Sıralı Kütle Spektrometresi ile Çoklu Kalıntı Tarama Analizi İçin Metot Geliştirilmesi, Bornova Vet. Bil. Derg., 34 (48): 17-30, 2012.
9. Granelli K, Elgerud C, Lundström A, Ohlsson A, Sjöberg P, (2009). Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 637: 87-91.
10. Kaya S, (1994). Besinlerdeki veteriner ilaç kalıntıları, bilimsel ve yasal denetim. Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim, 13-14, Ankara- Türkiye.
11. Kaya S, (2005). Gıdalarda Veteriner Hekimliği İlaçları ile İlgili Kalıntı Sorunu. Birinci Ulusal Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Eylül, 22-24, Ankara- Türkiye.
12. Marazuela MD, Bogianni S, (2009). A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. Anal. Chim. Acta, 645: 5-17.
13. Muñoz P, Blanca J, Ramos R, Bartolomé M, García E, Méndez N, Gomez J, Pozuelo MM, (2004). A versatile liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for the analysis of different groups of veterinary drugs. Anal. Chim. Acta, 529: 137-144.
14. Şanlı Y, (1994). Hayvan yetiştiriciliğinde antibakteriyel ilaç kullanımı ve çok yönlü sakıncaları. Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, Ekim, 13-14, Ankara- Türkiye.