

**Sütte Antibiyotik Kalıntıları ve Bunların Teşhis Metodları**

Doç. Dr. Özer ERGÜN — Dr. Huriye HOROZ

*I.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Ten. Anabilim D. — İSTANBUL**I.Ü. Vet. Fak. Doğum ve Reprodüksiyon Hast. B. Dah — İSTANBUL***GİRİŞ**

Mastitis ve diğer hayvan hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklerin kullanılması çok yaygın ve kaçınılmaz bir hale gelmiştir. Bu amaçla kullanılan antibiyotiklerin en önemlileri olarak şunları sıralayabiliriz: Penisilin, yarı sentetik penisilin (Beta-Laktamantibiyotik), aminoglikosit, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolitler, peptid antibiyotikler. Bunlar arasında en çok kullanılanları; Penisilin, penisilin-streptomisin kombinasyonları ve tetrasiklinlerdir. Ancak penisilin mastitis tedavisinde kullanılması süt endüstrisinde çok çeşitli ve geniş çaplı zararlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bilindiği üzere antibiyotikler süte en çok intramammar aplikasyonlar neticesinde karışmakta olup bunu sırasıyla parenteral, intramusküler ve oral aplikasyonlar takip etmektedir. Yemleme ile antibiyotiklerin süte geçmeleri kayda değer bir tehlike teşkil etmez.

**1 - Antibiyotiklerin Sütle Atılış Süreleri ve Bu Süreyi Etkileyen Faktörler**

Haaland ve arkadaşları, intrauterin infüzyon sonrası sütle antibiyotik kalıntılarının ne kadar süreyle tesbit edilebildiğini araştırmışlar ve Tablo 1'de gösterilen sonuçları almışlardır.

**Tablo 1. Antibiyotiklerin Sütle Atılma Süreleri**

Antibiyotik	Doz	Atılma Süresi (saat)
Kanamisin	2 x 500 mg	36 - 48
	3 x 500 mg	48 - 60
Chloramphenicol	1 x 1000 mg	72 - 96
	3 x 1000 mg	96 - 108
Ampicillin	1 x 1000 mg	48 - 72
Eytromycin	1 x 2000 mg	84
Tetracyclin	1 x 500 mg	60
	1 x 3000 mg	72 - 84

Bouchat ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarda antibiyotik kalıntılarının sütle atılma sürelerinin çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklikler gösterdiklerini gözlemişlerdir. Bu araştırmacılara göre süreyi şu faktörler etkilemektedir. Doz, tedavi gören meme lobu sayısı, aplikasyon adeti, süt miktarı, süt numunesinin alınış zamanı, süt bezlerinde patolojik değişiklikler ve antibiyotik süspansiyonu. Belirtilen nedenler arasında en önemlileri doz ve yağlı veya sulu çözelti oluşuna göre süspansiyonun yapısıdır.

**2 - Sütle Antibiyotik Kalıntılarının Meydana Getirdiği Rizikolar**

Antibiyotikli sütlerin tüketiminde insan sağlığına olası zararları hesap edilmelidir. Araştırmalar da göstermektedir ki hassas kişilerde böyle sütler alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedirler. Genelde hafif seyreden bu rahatsızlıklara öncelikle penisilin, sonra da sırasıyla tetrasiklinler ve kloramfenikol neden olmaktadır. Schmid, yaptığı gözlemlerde süt, et ve yumurta gibi hayvansal ürünlerde rastlanan kloramfenikol veya metabolitlerinin «aplastik anemi»de potansiyel bir faktör olduğu sonucuna varmıştır. Ayrıca antibiyotik kalıntıları barsak florasının tabii halinin değişimine neden oldukları gibi dayanıklı bakteri suşlarının oluşumuna da sebebiyet verirler. Ancak antibiyotikli sütlerin en büyük zararları, fermente süt ürünlerinin üretiminde oluşturdukları zorluklardır. Antibiyotikler, bilhassa penisilin, *Sc. cremoris*, *Sc. lactis*, *Sc. thermophilus*, *L. helveticus*, *L. lactis* gibi süt asidi bakterilerinin faaliyetlerini engeller. Bunun neticesinde de birçok süt ürünü için gerekli ekşime oluşmaz. Bu şekilde yoğurt oluşumu, peynir olgunlaşması ve tereyağında aroma teşekkülü zarar görmüş olur. Kültür bakterilerinin devre dışı kalması ile gram (—) bakterilerin üremeleri için iyi bir ortam hazırlanmış olur. 1 ml peynir sütünde 0,02 İ.Ü.'lük penisilin ekşimeyi geciktirdiği gibi peynirde anormal fermentasyonun

şekillenmesine de neden olur. Sütte 0,02 İ.Ü.'lük penisinin tereyağı aromasının bozulmasına neden olmaktadır. *B. stearothermophilus* ve süt

endüstrisinde önemi olan bakterilerin çeşitli antibiyotiklere hassasiyet gösterdikleri minimum miktarları Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2. *B. stearothermophilus* ve süt endüstrisinde önem taşıyan bazı bakterilerin antibiyotiklere hassasiyetleri.**

	Penicillin İ.Ü./ml mg/ml	Streptomycin m mg/ml	Chloramphenicol m mg/ml	Tetrasiklinler m mg/ml
<b>Sc.</b>				
<i>Thermophilus</i>	0,0017 - 0.17	0.5 - 5	0.05 - 0.1	0.001 - 0.01
<i>Sc. cremoris</i>	0.05 - 0.1	—	—	—
<i>Lb. bulgaricus</i>	0.3 - 0.6	—	0.3 - 0.5	—
<b>Tereyağı</b>				
Starterleri	0.017 - 0.17	0.1 - 0.2	0.1 - 0.2	0.02 - 0.1
Peynir Starterleri	0.05 - 0.2	0.04	0.04	0.01 - 0.025
<i>B. stearothermo- philus</i> var. <i>calidolactis</i>	0.001 - 0.008	0.6 - 1	1	0.6 - 1

Tablo 2'den de anlaşılacağı üzere *Str. thermophilus* penicilline karşı bi'hassa hassastır. Sütte antibiyotik teşhisi büyük bir hijyenik öneme sahiptir. Pastörizasyonun sütteki antibiyotik kalıntılarına bir tesiri yoktur. Penicilin, Aeromycin ve Streptomycin'in sütte parçalanmaları 120°C'de % 30-60 oranında olur. Bu sonuçlar sütte antibiyotik kalıntılarına karşı şu tedbirleri kaçınılmaz hale getirmiştir:

1 — Antibiyotik tedavisi görmüş hayvanların sütleri son tedavi işleminden 5 gün non-rasına kadar satışa çıkarılmamalıdır. Bu süre geniş spektrumlu antibiyotiklerde 13 güne kadar uzatılmalıdır.

2 — Sütün işlendiği fabrika ve işletmelere gelen sütlerde periyodik olarak antibiyotik araması yapılmalı, kalıntı taşıyan sütler geri çevrildiği gibi sahiplerine gerekli uyarılar yapılmalıdır.

3 — Sütte antibiyotik kontrolleri için güvenilir ve çabuk sonuç verebilecek metodlar geliştirip uygulamaya konulmalıdır.

### 3 - Sütte Antibiyotik Kalıntılarının Tesbitinde Kullanılan Metodlar

1 — Agar - diffüzyon Testieri (Delik Agar Testi) : Petride dondurulmuş bir agar besi ye-

rine (China-bıau, Lactose Agar, Kanlı Agar vb.) bir test mikroorganizması (*S. aureus*, *B. subtilis* vb.) sürülür (en hassas bakteri *B. stearothermophilus*'tur). Sonra steril bir delici ile, bu bir cam tüp de olabilir, agara delikler açılır. Açılan deliklere 85°C'de ısıtılıp soğutulmuş olan şüpheli süttten damlatılır. Sütün agar içinde daha iyi diffuz olması için petri ler sürme işleminden önce 2 saat buzdolabında ve daha sonra 6-7 saat etüvde 37°C'de tutulmalıdır. Test bakterilerinin sürülmesinden 8 saat sonra antibiyotikli sütlerin damlatıldığı deliklerin etrafında bakterilerin üreyemediği haleler oluşur. Aynı deney yuvarlak özel karton kağıt parçaları ile de yapılabilir.

2 — Fermentasyon Testi : Şüpheli süttten 10 ml alınarak 85°C'de 5 dk. tutulur ve 45°C'ye soğutulur. Üzerine 1 ml yoğurt kültürü ilave edilerek 42-43°C'de su banyosunda inkübasyona bırakılır. 2-2,5 saat sonra yapılan değerlendirmede kontrol örneği pıhtı tutmuş olmalıdır. Şüpheli numune antibiyotikler yönünden pozitif ise kıvam tutmamış ve sıvı halindedir.

3 — Lakmus - Fermentasyon Testi : 10 ml normal süttten, 10 ml'de şüpheli süttten ısıtılıp

soğutulur. 1 ml yoğurt kültürü, 1 ml % 10'luk maya ekstraktı ve 1 ml Lakmus tinkturu karıştırılır. 38°C'de su banyosunda tutulur. 3 saat sonra kontrol örneği koyu pıhtı kırmızı renge dönüşmüş olmalıdır. Antibiyotikli süt pıhtılaşmaz ve mavi kalır.

4 — Baktia - Strip - Antibiyotik Testi : Firma Baktia - Strip'tin piyasaya sunduğu hazır test kitleri ile uygulanan bir testtir.

5 — Enterotox Antibiyotik Testi.

6 — Yoğurt Karışık İndikatör Testi.

7 — Penisilin tesbit Testi : Bu teste içinde antibiyotik olduğu fermentasyon testi ile tesbit edilmiş sütlere penisilnaz enzimi katılarak bunun sağlanması yapılır. Buna göre penisilnaz, şüpheli sütteki penisilini parçalar ve fermentasyonun normal seyrine devamını sağlar. Böylece penisilin varlığı ispatlanmış olunur.

Testin Uygulanışı : 10 ml antibiyotikli olduğu tesbit edilen süt örneği ve 10 ml kontrol örneği 85°C'de 5 dk ısıtılır, 30°C'ye kadar soğutulur. Antibiyotikli süte 20.000 İ.Ü. Penisilnaz ilave edilir. 30°C'de 30 dk ön inkübasyondan geçirilir. Sonra 1 ml yoğurt kültürü katılarak 2-2,5 saat 42-43°C'de su banyosunda tutulur. Fermentasyonun şüpheli örnekte, kontrol örneğindeki gibi oluşması, bu örnekte gerçekten penisilin var olduğunu gösterir.

8 — Kaşar Peynirinde Antibiyotik Kalıntısı Tesbiti : Steril bıçakla kesilen peynir yüzeyi China blau, Bauillon agar veya Kanlı agar üzerine bastırılır. Antibiyotik kalıntısı gram (+) streptococcların üremelerini engeller, ki bu bakteriler normal peynirde çok sayıda bulunurlar. Bu sebepten gram (—) bakteri ağırlıklı bir üreme görülür.

9 — Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Redüksiyon Testi : 10 ml çiğ süt, tüp içinde 5 dk 80°C'de ısıtılır. Soğutulduktan sonra 1 ml yoğurt kültürü konulur (1/1 yağsız steril normal sütle seyreltik olarak). 37°C'de 2 saat bekletildikten sonra 0,3 ml % 4'lük TTC eriyiğinden ilave edilerek karıştırılır. Su banyosunda 30 dk'lık ikinci bir bekletmeden sonra antibiyotik kalıntısının varlığında süt örneği beyaz kalır.

Kalıntının olmaması halinde kırmızı renk oluşur (TTC formazana dönüşür). Pembeleşme ve hafif kırmızı renk şüpheyi gerektirir.

10 — Metilen Mavisi Redüksiyon Testi : 10 ml süt 80°C'de 10 dk ısıtılır. 40-45°C'ye soğutulduktan sonra 0.5 ml metilen mavisi çözeltisi ve 0,2 ml Str. thermophilus ilave edilir ve 42°C'de bekletilir. 1 saat sonra rengin kaybolup kaybolmadığına bakılır. Bu test ile 0,01 İ.Ü./ml'de antibiyotik kalıntısı tesbit edilebilir.

Metilen Mavisi Eriyiğinin Hazırlanışı : % 96'lık alkolde soğuk doymuş metilen mavisi eriyiği hazırlanır. 24 saat sonra filtre edilir. Filtre edilen sıvıdan 5 ml alınarak üzerine 195 ml steril distile su ilave edilir.

11 — Brillant Schwarz - Redüksiyon Testi : Bu test agar diffüzyon testi ve reduksiyon testinin bir kombinasyonu olup Karaack ve Tolle tarafından geliştirilmiş bir testtir. Test mikroorganizması olarak **Bacillus stearothermophilus var. Calidolactis** kullanılır. Brillant schwarz ihtiva eden ve test bakterisi ile karışık bir besi agarına şüpheli süttten katılır. Buzdolabında bir ön inkübasyondan sonra 60°C'de ve daha yüksek ısılarda inkübe edilir. Sarı renk test bakterisinin ürediğini gösterir. Mavi renk antibiyotiğin varlığına işaret eder. Bu metod ile 0,0087 İ.Ü./ml penisilin tesbit edilebilir. Bu test ile süt içindeki antibiyotik kalıntılarını tesbitte minimum değerler şöyledir : Penisilin G; 8 İ.Ü./kg, Ampisilin 0,06 mg/kg, Tetrasiklin 0,8 mg/kg, Streptomisin 8 mg/kg, Kloramfenikol 20 mg/kg'dır.

12 — Süt Asidi Bakterilerinde Morfolojik Değişikliklere Göre Antibiyotik Tesbiti : Antibiyotik şüpheli süt örneğine Str. thermophilus veya yoğurt kültürü ilave edilir, 40°C'de 60-90 dk. tutulduktan sonra metil mavisi ile boyanarak mikroskopta incelenir. Aynı işlem normal bir süt numunesinde de yapılarak mukayese edilir. Hücrelerde anormal irileşme veya uzama, küme sayısında azalma antibiyotik varlığını gösterir. Koklarda uzunluğuna çekilme olur. Neredeyse çubuğa benzerler ve düzensiz zincirler oluştururlar. Boya kabul etmeleri zorlaşır veya yok olur. Lactobaciller uzun ve iplik gibi olurlar.

13 — Hızlandırılmış Enzim İmmunolojik Test : Schneider ve Terplan tarafından geliştirilen bu metoda sütte kloramfenikol kalıntıları 1 mg/ml gibi çok düşük oranlarda dahi çok çabuk bir şekilde tesbit edilebilmektedir. Arnold ve arkadaşları da radioimmunolojik metodlarla sütte kloramfenikol (1 gr/kg) tesbit ettiklerini bildirmişlerdir.

14 —  $\beta$ -Lactam Tipi Antibiyotiklerin Enzimatik Yolla Tesbiti : Laloux ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir metodla  $\beta$ -Lactam tipi

antibiyotikler 0,01 - 0,02 İ.Ü./ml süt konsantrasyonlarında 10-20 dk süre içerisinde tesbit edilmektedir.  $\beta$ -Lactam ant.biyotiklerle çözünebilen D-A-la-D-Ala Carboxpeptidas arasındaki reaksiyonun temel teşkil ettiği bu metodun, klasik metodlardan daha hassas ve 8-9 ml'li daha hızlı olduğu bildirilmektedir.

Açıklanan bu testlere ek olarak Kelly, Delvotest; Holtmanspötter ise gaz kromatografisi ile sütte antibiyotik kalıntılarını tesbit etmişlerdir.

#### KAYNAKLAR

- Arnold, D., Derg, D., Vom Boertz, A.K., Mallick, U., Somogyi, A. : Radioimmunologische Bestimmung von Chloramphenicol Rückständen in Muskulatur, Milh und Eiern. Archiv F. Lebensmittelhygiene 35 (6) 131-136 (1984).
- Blöbel, H., Schliepes, T. : Handbuch der bakteriellen Infektionen - bei Tieren. Gustav Fischer Verlag - Stuttgart - New York (1980).
- Bouchot, M.C. : Factors influencing excretion of antibiotics in milk. Recueil de Medecine Veterinaire 157 (2), 191-197 (1981) (Milchwiss. 38 (12) 765 (1983) :
- Burgat, Sacaze, Y. : Risque d'accidents allergiques dus aux re'sidus. Recueil de Medecine Veterinaire 157 (2), 187-190 (1981).
- Ebrecht, A. : Verbessertes Nachweis von Hemmstoffen in Milh. 1. Mitteilung : Brillant : Schwarz-Reduktionstest ohne Vordiffusion auf einem neuen Enterotox-Testtablett. Deutsche Milchwirtschaft (14), 416 (1985).
- Gedek, W. : Hemmstoffe in der Milh : Alte und neue Fragen Deutsche Molkerei Zeitung 105 (50) 1779-1787 (1984).
- Graevert, H.O. : Die Milh. Erzeugung, Gewinnung, Qualität, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1983).
- Haaland, M.A., Manspeaker, J.E., Moreland, T.W. : Antibiotikarückstände in der Milh nach intrauteriner Infusion. Milchwiss. 40 (7), 439 (1985).
- Heeschen, W., Bluthgen, A., Nijhuis, H. : Aktuelle Rückstandsfragen in Milh und Milchprodukten. Deutsche Milchwirtschaft 35 (37), 1388-1395 (1984).
- Holtmanspötter, H., Thier, H.P. : Analysenmethode auf Rückstände von sechs Sulfonamiden und Chloramphenicol durch Gaschromatographie an Glaskapillaren. Deutsche Lebensmittelwirtsch. 78 (19), 347-350 (1982). IDF Document, 113 (1979).
- Kelley, W.N. : Qualitative ampule and multitest for beta-lactam residues in fluid milk products: Collaborative Study. J. of the Association of Official Analytical Chemists 65 (5), 1193-1207 (1982).
- Kotterer, R. und Münch, S. : Untersuchungsverfahren für das milchwirtschaftliche Laboratorium. Verlag Th. Mann OHG, Hildesheim (1970).
- Kraack, J., Tolle, A. : Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145-149.
- Laloux, C. : Gesetzliche Maßnahmen zur Verhinderung des Antibiotikavorkommens in Milh. Milchwiss. 38 (12) 6 765 (1983).
- Laloux J., Degelaeu, J., Colart, T.P. : Eine enzymatische Methode zum Schnellnachweis von Antibiotika vom Beta-Lactam-Typ in Milh. Milchwissenschaft 38 (7) 422 (1983).
- Mc Clary, D.E. : B. stearothermophilus disk assay detection of penicillin in milk of dairy cows after postestrial intrauterine infusion. American J. of Veterinary Research 45 (3), 416-419 (1984).
- Meser, J.W. ve ark. : Bacillus stearothermophilus disk assay for detection of inhibitors in milk: Collaborative Study. J. of the Assoc. of Official Anal. Chem. 65 (5), 1209-1215 (1982).
- Obiger, G. : Milchwissenschaft 16, 359 (1961).
- Ovenby, A. : J. Dairy Sci. Abstr. 16, 1 (1954).
- Schmid, A. : Chloramphenicolrückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft als potentielle Ursache der aplastischen Anämie des Menschen. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 90 (6), 201-248 (1983).
- Schneider, E. : Entwicklung und Anwendung von enzymimmunologischen Teststreifen - Verfahren zum Nachweis von niedermolekularen Rückständen (Mykotoxine, Chloramphenicol) Dissertationarbeit, IM - Universität, München (1991).