TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PASTÖRİZE VE UHT SÜTLERDE ANTİBİYOTİK KALINTILARININ HPLC YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Baransel GEÇER

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr. Sadi AKGÜN

2006-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PASTÖRİZE VE UHT SÜTLERDE ANTİBİYOTİK KALINTILARININ HPLC YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Baransel GEÇER

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sadi AKGÜN

Bu tez, Kara Harp Okulu Komutanlığı Savunma Bilimleri Enstitüsü ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Teknik Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAUM) tarafından desteklenmiştir.

2006-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 27.02.2006

Prof. Dr. İrfan EROL
Ankara Üniversitesi Veteriner Fak.
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sadi AKGÜN
Ankara Üniv.Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Belgin SARIMEHMETOĞLU
Ankara Üniv.Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. U. Tansel ŞİRELİ
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Hasan AYÇİÇEK
Gülhane Askeri Tıp Akademisi

İÇİNDEKİLER

Kabul Onay i
İçindekiler ii
Önsöz iv
Simgeler ve Kısaltmalar v
Tablolar vi
Çizelgeler vi
Şekiller vii
1. GİRİŞ 1
1.1ANTİBİYOTİKLER 5
1.1.1PENİSİLİNLER 5
1.1.2 TETRASİKLİNLER 6
1.2 SÜTTE ANTİBİYOTİKLERİN SAPTANMASI 8
1.2.1 BETA LAKTAM VE TETRASİKLİNLERİN TAYİNİ 10
1.3 ANTİBİYOTİKLERİN SÜTE GEÇİŞİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER 11
1.3.1 ANTİBİYOTİK ÇEŞİDİ VE KULLANIM DURUMU 12
1.4. ANTİBİYOTİK KALINTISI İÇEREN SÜTLERİN MEYDANA GETİRDİĞİ SORUNLAR 15
1.4.1 İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ 15
1.4.2 ANTİBİYOTİK KALINTILARININ SÜT ÜRÜNLERİNDE YARATTIĞI SORUNLAR 19
1.4.3 DİRENÇLİ SUŞLARIN GELİŞİMİ 22
1.5 MEVZUAT 27
1.6 KORUNMA VE KONTROL 29
2 GEREÇ VE YÖNTEM 33
2.1 GEREÇLER 33
2.1.1 ANTİBİYOTİK STANDARTLARI 33
2.1.2 STOK ÇÖZELTİLER 33
2.1.3 ÇALIŞMA ÇÖZELTİLERİ 34
2.1.4 ÇÖZÜCÜLER VE DİĞER KİMYASALLAR 34

2.2 YÖNTEM 35
2.2.1 CHARM ROSA TEST KİTLERİ İLE SÜTLERDE KALINTI ARANMASI 35
2.2.2 HPLC YÖNTEMİ İLE TETRASİKLİNLERİN ANALİZİ 37
2.2.3 HPLC YÖNTE İLE β-LAKTAM(PENİSİLİN G)'NIN ANALİZİ 41
3. BULGULAR 45
3.1 HPLC YÖNTEMİYLE PASTÖRİZE SÜTLERDE TESPİT EDİLEN ANTİBİYOTİK KALINTILARI VE ÇEŞİTLERİ 47
3.2 HPLC YÖNTEMİYLE UHT SÜTLERDE TESPİT EDİLEN ANTİBİYOTİK KALINTILARI VE ÇEŞİTLER 48
4. TARTIŞMA 51
5. SONUÇ 57
ÖZET 56
SUMMARY 59
KAYNAKLAR 60
ÖZGEÇMİŞ 71

ÖNSÖZ

Veteriner hekimlikte antibiyotik kullanım sonucu kasaplık hayvanların et ve iç organları ile yumurta ve sütteki antibiyotik kalıntıları, insanlarda toksik, alerjik reaksiyonların ortaya çıkmasının yanı sıra, mikroorganizmalarda direnç gelişimi gibi önemli etkilerin meydan gelmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin, insan hekimliğinde kullanılan antibiyotiklerle aynı olmaması, dolayısıyla insan hekimliğinde kullanılan antibiyotiklere karşı çapraz rezistans oluşmaması, uygulanan antibiyotiklerin rezorbe edilir olmaması veya yalnızca düşük seviyede rezorbe edilebilir olması gerekmektedir. Gıda güvenliğinin sağlanması ve halk sağlığının korunması amacıyla, antibiyotik tedavilerinde uygulamadan sonra gerekli atılma ve bekleme süresine dikkat edilmeli ve tüketime hazır ette (kırmızı, kanatlı, balık), sütte ve yumurtada, bulunabilecek en yüksek kalıntı miktarlarının(MRL) aşılmasına izin verilmemesi gerekmektedir. Bu çalışmayla Ankara piyasasında satılmakta olan Pastörize ve UHT sütlerde bazı antibiyotiklerin kalıntı varlığı ve miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmamın seçilmesi ve yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Sadi AKGÜN ve başta Bölüm Başkanımız Prof. Dr. İrfan EROL olmak üzere değerli bölüm hocalarıma, tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Vet. Hekim Yzb. Çetin KOCA'ya, Silah arkadaşlarıma, Dr.Uzm.Vet.Hekim Seda BİLİR ORMANCI'ya, Ankara Üniversitesi Bilimsel Teknik Araştırma ve Uygulama Merkezinde görevli Kimyager Nilüfer VURAL'a, Prof. Dr. Müh. Kd. Alb. Taner ALTINOK'a, Uzm. Vet. Hekim Kd. Alb. Mahmut TUNÇBİLEK'e, Uzm. Vet. Hekim Yb. Serdar ÇAKIROĞLU'na, bölümdeki Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına, bugünlere gelmemde maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen değerli aileme teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

mg	Miligram
mL	Mililitre
spp	Species
µg	Mikrogram
n	Number (sayı)
MRL	Maximum Residue Limit
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point (Tehlike Analizleri Kritik Kontrol Noktası)
dk	Dakika
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Teşkilatı)
ppb	Milyarda bir ölçü birimi
ppm	Milyonda bir ölçü birimi
APA	Amino Penisiloinik Asit
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
MS	Mass Spektrometri
LC	Liquid Chromatography
GC	Gas Chromatography
TLC	Thin Layer Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CE	Capillar Electrophoresis
UV	Ultraviola
FAO	Food and Agriculture Organization
CDC	Centers Diseas Control
WHO	World Health Organizaton
CCRVD	Codex Committe on Residue of Veterinary Drugs in Food
JECFA	Joint WHO/FAO Expert Committe on Food Additives
EMEA	European Agency fort he Evaluation of Medicinal
OIE	Office İntenationale des Epizooties
UHT	Ultra High Temperature

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Değişik ülkelerde yapılan kalıntı çalışmaları	2
Çizelge 1.2.	Türkiye'de yapılan çalışmalar	3
Çizelge 1.3.	Sıcaklığın bazı antibiyotiklere etkisi	4
Çizelge1.4	Sütte aranacak maddeler	9
Çizelge 1.5	Beta laktam grubu antibiyotiklerin süte geçme miktarları	12
Çizelge 1.6	Memeye uygulanan antibiyotik dozu ve sütte kalış süresi	13
Çizelge 1.7	Çeşitli uygulama şekillerinde penisilinin sütle atılması	14
Çizelge 1.8	Bu çalışmada kullanılan antibiyotiklerin günlük alınmasına izin verilen tolerans düzeyleri	18
Çizelge1.9	Düşük konsantrasyonlardaki Penisilin ve tetrasiklinnin Edam ve Emmental peynirlerin kalitesi üzerine etkileri	20
Çizelge 1.10	Yoğurt bakterilerinin çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdikleri hassasiyet	21
Çizelge1.11	Bazı antibiyotiklerinEU/kodeksine ve Türk gıda kodeksine göre sütteki MRL seviyeleri	28
Çizelge2.1	Oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin'in alıkonma zamanları	38
Çizelge 2.2	Oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin ait geri kazanım oranları	41
Çizelge 2.3	Penisilin G alıkonma zamanı	42
Çizelge 2.4	Penisilin G geri alma yüzdesi	44
Çizelge 3.1	UHT sütlere ait Charm Rosa test kitleri sonuçları	44
Çizelge 3.2	Pastörize sütlere ait Charm Rosa test kitleri sonuçları	45
Çizelge 3.3	Charm rosa test kitleri ile analizi yapılan pozitif sonuç veren 26 adet Pastörize süt örneğinin HPLC yöntemiyle elde edilen kalıntı düzeyleri	46
Çizelge 3.4	Charm rosa test kitleri ile analizi yapılan pozitif sonuç veren 10 adet UHT süt örneğinin HPLC yöntemiyle elde edilen kalıntı düzeyleri	47
Çizelge 3.5	Firmalara göre MRL seviyeleri üzerinde saptanan örnek miktarları	49
Çizelge 3.6	Elde edilen verilerin oransal sonuçları	50

ŞEKİLLER

Şekil 1.1	Sütte inhibitör, antibiyotik kalıntılarının bulaşmalarının önlenmesinde yararlanılan entegre bir sistemde sorumluluk paylaşımı	31
Şekil 1.2	Entegre bir sistemde antibiyotik kontrolü	32
Şekil 2.1.	Beta laktam ve tetrasiklin test kitleriyle bakılmış pozitif numunelere ait görüntü	36
Şekil 2.2.	Oksitetrasiklin, tetrasiklin ve klortetrasikline ait kromatogram	38
Şekil 2.3	Oksitetrasiklin, tetrasiklin ve klortetrasikline ait kromatogram	39
Şekil 2.4	Oksitetrasiklin kalibrasyon grafiği	39
Şekil 2.5	Tetrasiklinin kalibrasyon grafiği	40
Şekil 2.6	Klortetrasiklin kalibrasyon grafiği	40
Şekil 2.7	Penisilin G'ye ait standart kromatogram	42
Şekil 2.8	Penisilin G kalıntısı tespit edilen bir örneğe ait kromotogram	42
Şekil 2.9	Penisilinin kalibrasyon grafiği	43

1.GİRİŞ

Gıdalarda ilaç kalıntısı problemlerine bilinçli yaklaşım, 1900'lü yıllarda trematol adlı bitkisel maddenin buzağılarda ve bu maddeyi içeren sütü tüketen insanlarda zehirlenme semptomlarının görülmesiyle başlamıştır. II. Dünya Savaşı sonrasına kadar et ve sütte kimyasal madde kalıntı problemleri belirgin bir artış göstermiştir. Penisilinin 1950'lerde mastitis sağaltımında yaygın olarak kullanılması ve bu dönemlerde süte bağlı olarak, insanlarda görülen alerjik olayların yanı sıra, süt ürünlerindeki starter kültürlerin penisilin tarafından baskı altına alınmasıyla ilaç kalıntılarının sağlık ve ekonomik yönden ciddi zararlara sebep olduğu anlaşılmıştır. 1993-1994 yıllarında Amerika'da 4.2 milyon adet süt örneği analiz edilmiş, sonuç olarak 30.9 milyon kg sütün pozitif çıkması sonucu döküldüğü rapor edilmiş bunun maliyetinin yaklaşık 8.2 milyon dolar olduğu bildirilmiştir. Ayrıca 4.3 milyon test kitinin maliyetinin de 8-35 milyon dolar arasında olduğu bildirilmiştir. Iowada yapılan araştırmalarda 181 tank dolusu süt pozitif bulunmuş, bunun da yaklaşık 1 milyon dolar civarında bir ekonomik kayba yol açtığı bildirilmiştir (Imerman ve ark. 1996; Baydan ve ark.1997; Oka ve ark. 1998; Schenck ve Callery 1998; Ghidini ve ark. 2003)

Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi ile yemden yararlanmanın arttırılması veya gelişmenin hızlandırılması amacıyla ilaç kullanımı günümüzde vazgeçilmez bir uygulama haline gelmiştir Bu amaçla kullanılan antibiyotiklerin en önemlilerinin β-laktam grubu ile tetrasiklin grubu antibiyotikler olduğu bildirilmiştir (Kaya ve ark. 1992; Özer ve Horoz 1992; Mayra-Makinen 1995; Jevinova ve ark. 2003;Andrew, 2000; Schenck ve Callery 1998; Takeba ve ark 1998;).

Antibiyotikler, geliştirilmelerinden kısa bir süre sonra, tedavi amacıyla ilk olarak süt sığırlarında kullanılmaya başlanmıştır. Penisilinler 1940'dan itibaren tedavi amaçlı olarak kullanılırken, büyümeyi arttırıcı özelliklerinin 1950 yılında keşfedilmesiyle bu alanda da kullanılmaya başlanmıştır (Mitchel ve ark. 1998; Güley ve Akbulut 2000). Gelişmenin hızlandırılması amacıyla yem katkı maddesi halinde antibiyotiklerin yaygın bir şekilde kullanılması duyarlı bakterilerin dirençli suşlarının

ortaya çıkması gibi problemler yaratmıştır ki, bundan dolayı bu tür antibiyotikler kullanım ömrünü tamamlamak zorunda kalmıştır (Kaya ve ark. 1992). Süt sığırlarında kullanılan antibiyotiklerin tümü belli düzeylerde süte geçebilmektedir. Hayvansal gıdaların üretiminde ve hayvanların sağaltımında kullanılan ilaçların, belirli bir yarılanma ömrü bulunmaktadır. Bu yarılanma ömrüne dikkat edilmesi gıda da kalıntının yasal olarak izin verilen düzeye düşmesi için önemlidir. Kalıntı düzeylerinin belirlenmesi zorunluluğu etik, toplum sağlığı, süt teknolojisi ve çevresel nedenlerden kaynaklanmaktadır. Hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntılarının bulunması toplum sağlığı ve gıda güvenliği açısından gıdalarda mevcut kalıntı düzeyleri üzerine daha fazla yoğunlaşılması gerekmektedir (Honkanen ve Reybroeck 2000; Kınık ve ark. 2002).

Sütteki antibiyotik kalıntılarının önemini kavrayan pek çok ülkede antibiyotik kalıntı miktarını belirlemek amacıyla araştırmalar yapılmıştır. (Çizelge1.1) (Haverbeck ve ark. 1987; Shitandi 2002). Süt endüstrisinin gelişmiş olduğu ülkelerde, sürekli kontroller sayesinde oran azalmaktadır. Antibiyotikli süt oranı her ülkede farklılık göstermektedir. 1996 yılında FDA' nın Ulusal Süt Veri Dairesine (National Milk Data Base) dayanarak yayınladığı rapora göre yapılan bir araştırmada 4 480 530 süt örneği antibiyotik kalıntısı yönünden test edilmiş, 6148 örnekte pozitif bulunduğu bildirilmiştir (Moats ve Romanowski 1998).

Çizelge 1.1. Değişik ülkelerde yapılan kalıntı çalışmaları (Shitandi 2002)

Ülke	**Antibiyotik kalıntı oranı %**	**Kontrol programı uyg.**	**Referans**
Brezilya 2000-2001	4.3-50	Yok	Borges ve ark. 2000 Folly machado 2001 DoNascimento 2001
Hindistan 1995	9	Yok	Sudershan ve Bhat 1995
Polonya 1995	13-22	Yok	Rybinska ve ark. 1995
İsveç	0.26-0.08	Var	Sternesjo ve Johnson 1998-2003
9 Avrupa ülkesi 1990	1.2-1.5	Var	Suhren ve ark. 1990

Türkiye'de Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Ulusal kalıntı izleme planı çerçevesinde ve çeşitli araştırmacılar tarafından çiğ süt, pastörize süt ve UHT(Ultra High Temperature) sütlerde farklı yöntemlerle araştırmalar yapılmış durum ortaya konulmaya çalışılmıştır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 Türkiye'de yapılan çalışmalar

Aranan antibiyotik	**Materyal**	**Kalıntı oranı**	**Yöntem**	**Referans**
β-laktam Sülfadimidin	Çiğ Süt	β-laktam % 24 Sülfadimidin % 8	Belirtilmemiş	Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı (2000)
β-laktam	281 Süt örneği	β-laktam %24	Belirtilmemiş	Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı (2001)
Sülfadimidin	201 süt örneği	Sülfadimidin % 29.3	Belirtilmemiş	Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı (2002)
β-laktam	194 adet süt	β-laktam % 10.85	Belirtilmemiş	Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı (2003)
β-laktam Sülfadimidin	185 Çiğ süt 185 Çiğ süt	β-laktam % 14 Sülfadimidin % 3.7	Delvotest Eliza	Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı (2004)
Penisilin	204 Çiğ süt	% 15.7	İntertest Agar difüzyon	Aydın ve ark. (1989)
Penisilin	100 çiğ süt 50 pastörize süt 50 UHT süt	%5.5	İntertest	Ceyhan ve Bozkurt (1987)
Penisilin G Ampisilin Penisilin V	50 çiğ süt	Penisilin G % 12 Ampisilin % 0 Penisilin V % 0	HPLC yöntemi	Demet ve ark.(1992)
Penisilin Tetrasiklin	444 çiğ süt	Penisilin % 8.75 Tetrasiklin % 5.4	İntertest Agar difüzyon	Önal ve ark.(1993)
Penisilin	Kamu 182 çiğ süt Özel 153 çiğ süt	Kamu %6 Özel % 14.3	İntertest Agar difüzyon	Temiz ve Öner (1988)
Penisilin	77 pastörize süt	% 6.48	TTC	Temiz ve Çelik (1990)
Penisilin	350 pastörize süt	% 6.28	İntertest Agar difüzyon	İleri ve Karaboz (1993)
Penisilin Tetrasiklin	150 çiğ süt	Penisilin % 18 Tetrasiklin % 7.33	İntertest Agar difüzyon	Dokuzlu ve Tayar (2001)

Antibiyotik kalıntısı içeren sütlerdeki kalıntı, kaynatma veya pastörizasyon işlemleriyle ortadan kaldırılamamaktadır. Süt ve ürünlerindeki ilaç kalıntılarının yıkımlanması için, uzun süreli kaynatma işlemlerinin uygulanması da protein ve vitaminlerde yıkımlanmaya neden olacağından geçerli yöntemler olarak değerlendirilmemektedir. Örneğin 0,40-0,50 μg/mL tetrasiklin içeren sütün 62°C'de 30 dk ısı işlemi uygulanması sonucunda sütteki kalıntı düzeyinin %83,4 olduğu, 2.5

I.U/mL penisilin G içeren sütün yine 100°C de 30 dk ısı işlemi uygulanması sonucu sütteki varlığını %71,8 düzeyinde devam ettirdiği bildirilmektedir (Çizelge 1.3) (Jackson, 1999;Vautier ve Postigo 1986;Baydan ve ark., 1997; Akgün, 2004).

Podhorniak ve ark. (1999), değişik sıcaklıklarda muhafazanın antibiyotik kalıntıları üzerine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada çiğ sütte 50 ppb oksitetrasiklin uygulayıp –70, +4 ve +25°C'de beklettikten sonra HPLC ile analiz etmişlerdir. Sonuçta sütteki oksitetrasiklin düzeyinde az miktarda kayıp olduğu ve değişik derecelerdeki muhafaza işlemlerinin kalıntıya yönelik etkisi olmadığını bildirmişlerdir.

Çizelge 1.3: Sıcaklığın bazı antibiyotiklere etkisi (Jackson 1999)

Antibiyotik	**Konsantrasyon**	**Sıcaklık°C/uyg zamanı(dk)**	**İndirgenme oranı %**	
			Süt	**Su**
Klortetrasiklin	0.30-0.51µg/mL	62°C-30 dk	16.6	32.5
	0.20-0.62µg/mL	71°C-30 dk	27.6	51.2
	0.40-0.50µg/mL	121°C-15 dk	100	100
Oksitetrasiklin	0.32-3.22µg/mL	62°C-30 dk	23.6	-
	0.40-1.29µg/mL	71°C-30 dk	35.6	-
	0.50-0.55µg/mL	71°C-190 dk	100	-
Penisilin G	0.13-.96I.U/mL	62°C-30 dk	8.2	54.7
	0.25-1.07I.U/mL	71°C-15 dk	10.1	100
	0.25-1.04 I.U/mL	121°C-15 dk	59.7	100
Kloramfenikol	1 mg/mL	70°C- 30 dk	30	11.1
		100°C- 30 dk	35	30
Streptomisin	1 mg/mL	70°C- 30 dk	8.3	25
		100°C- 30 dk	41.7	33
Neomisin	1 mg/mL	70°C- 30 dk	10	11.1
		100°C- 30 dk	35	25
Penisilin G	2.5 I.U/mL	70°C- 30 dk	30	30
		100°C- 30 dk	32.2	40

1.1 Antibiyotikler

1.1.1 Penisilinler

Penisilin ilk bulunan en önemli antibiyotiklerdendir. Etki spektrumu dar bir madde olan penisilin ana molekülü üzerinde yapılan çalışmalar sonucu ampisilin, amoksisilin, azlosilin, karbenisilin gibi spektrumu geniş ve çok sayıda yarı sentetik penisilin türevi bulunmuş ve sağaltımda kullanılmaya başlanmıştır.

Penisiline ilişkin ilk bilgileri 1928'de A.Fleming vermiştir. Araştırıcı, petri kutularında stafilokok kolonilerine bulaşan penisilyum küfünün çevresindeki bakterilerin üremediğini görmüş ve bunu antibiyoa olarak kaydetmiştir. Anılan küfün stafilokokların üremesini engelleyen bir madde şekillendirdiği ve salgıladığından şüphelenmiştir ve buna penisilin adını vermiştir. Di Vigneaud 1956'da penisilini sentezlemiş ve bundan bir yıl sonra da Batchclor, Doyle, Meyler ve Robinson'dan oluşan grup penisilinin ana çekirdeği olan 6-amino penisillanik asitin(6-APA) senteziyle ilgili metotları geliştirmiştir. Penisilin büyük ölçüde *Penicillium notatum* ve *Penicillium chrysogenum* mantarlarından elde edilir. Günümüze kadar 40'dan fazla penisilin türevi hazırlanmıştır. Bunların bazıları doğal kültür ortamından, bazıları kültür ortamına ön maddelerin katılmasıyla biyosentetik ve bazıları da 6-APA'ya değişik grupların bağlanmasıyla yarı-sentetik olarak elde edildiği bildirilmektedir (Wilson ve Schild, 1952; Grollman ve Grollman, 1970; Huber, 1974;Vaden ve Riviere, 2001;Kaya ve Ünsal 2000; Anon, 1987).

Bakterilere karşı etkinlik için 6-APA'nın bütünlüğünü koruması gerektiği, 6-APA'daki β-laktam halkasının β-laktamazlar tarafından açılmasıyla penisilloik asit şekillendiği; bunun bakteriler üzerinde etkisi olmadığı fakat vücutta proteinlerle birleşerek antijenik bir özellik kazandığı bunun da önemli bir sakınca oluşturduğu, bu sebeple penisilloik asitin, penisilin alerjisinden sorumlu olduğu bildirilmektedir. Bazı bakteriler tarafından salgılanan amidazlar veya asidik şartlar penisilinlerin amid bağını kopardığı; böylece 6-APA ve asidik bir madde oluştuğu bildirilmiştir. Penisilinlerde 6-APA'nın serbest karboksil grubu genellikle potasyum, sodyum,

prokain, benzatin ve klemizol ile kapatıldığı bildirilmektedir Doğal penisilinlerin etkinliği Oxford Ünitesi veya Uluslararası Ünite (I.U) ile değerlendirilir. Bir ünite penisilin birimi, 0.6µg miktarındaki arı kristal benzil penisilin G sodyum etkinliğine eşdeğerdir. Yarı sentetik penisilin çeşitlerinin dozu genellikle mg olarak ifade edilir (Wilson ve Schild, 1952; Grollman ve Grollman, 1970; Huber, 1974;Vaden ve Riviere, 2001;Kaya ve Ünsal 2000; Akgün, 2004).

Penisilinler emildikten sonra vücutta genellikle hücre dışı sıvıda dağılırlar. İyonize halde bulundukları ve suda iyi çözündükleri için, biyolojik zarları zor aşarlar. Dolaşımda bulunan benzilpenisilinin %65'i albumine bağlanır, %10'u alyuvarlara girer. Vücutta kolay parçalanmaz ve %90 kadarı değişmemiş halde böbreklerden atılır; sütteki yoğunlukları plazmadakinin %13 ile %30 doz kadardır. Ampisilin ve kloksasilinin ise sütle atılımı daha yüksektir (%24-33). Bu durum hem süt ürünlerinin imalatını olumsuz yönde etkilemekte, hem de penisiline duyarlı kişilerde alerjiye yol açması bakımından önemli olmaktadır (Wilson ve Schild, 1952; Grollman ve Grollman, 1970; Huber, 1974;Vaden ve Riviere, 2001;Kaya ve Ünsal 2000).

1.1.2 Tetrasiklinler

Bu ilaçların ilk üyesi olan klortetrasiklin 1948'de Duggar tarafından *Streptomyces aureofaciens*, bundan 1 yıl sonra da oksitetrasiklin Finlav tarafından *Streptomyces rimosus* kültürlerinden elde edilmiştir. Klortetrasiklinden bir molekül klorun uzaklaştırılmasıyla 1952'de yarı sentetik olarak tetrasiklin hazırlanmıştır. Tetrasiklinler amfoter maddelerdir, yani asit ve bazlarla tuzlar yaparlar. pH 7'de suda çok az çözündükleri, dolaşıma geçen ilaçlardan oksitetrasiklinin, plazma proteinlerine %20-40, tetrasiklinin %45-65, klortetrasiklinin %50-70 oranlarında bağlandığı bildirilmiştir. Tetrasiklinlerin vücutta kısmen biyotransformasyona uğradıkları, idrar, dokular ve dışkıda en fazla bulunan metabolitlerinin tetrasiklin ana maddesi olduğu bildirilmektedir. Tüm tetrasiklinlerin safrada plazmadakine göre 5-10 katı daha yüksek yoğunlukta bulunduğu bildirilmiştir. Tetrasiklinler büyük ölçüde idrarla, İkinci derecede safra yoluyla atılırlar. Bu yolla bağırsaklara gelen

tetrasiklinlerin bir kısmının geri emilerek entero-hepatik dolaşıma katıldığı ve etkili yoğunluklarda süte de geçtiği saptanmıştır. Bileşik çeşidine göre, süte geçen miktarları değişmekle beraber, sütte genellikle plazmadaki yoğunluklarının %50'si oranında bulunduğu, klortetrasiklinin ise sütteki düzeyinin plazmadakine eşit veya daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Parenteral olarak ineklere 2-4 mg dozlarda verilen oksitetrasiklinin 6 saat sonra, sütte 0.9-1.9 μg/mL ve 2.5 mg/kg dozda verilen klortetrasiklinin 2.5-5 μg/ml arasında değişen yoğunlukta süte geçtiği bildirilmiştir (Grollmann ve Grollman, 1970; Huber, 1974; Riviere ve Spoo, 2001; Kaya ve Ünsal 2000).

Bütün tetrasiklinlerin plasentaya geçtiği ve fötal dolaşıma katıldığı böylece önemli ölçüde prostat, eklem ve göz sıvıları ile süt ve yumurtaya da geçtiği gebelik sırasında uzun süre tetrasiklin verilmesinin, fetusta, kemiklerde ve süt dişlerinde renklenme yapmaları yanında gelişme bozukluklarına ve deformasyonlara neden olabildiği bildirilmiştir (Riviere ve Spoo, 2001; Önal ve ark. 1993; Şanlı ve Kaya 1991).

Yapılan bir çalışmada Holştayn ineklerine (2gr Klortetrasiklin bolus) formülasyonunda vajinal ve intrauterin yoluyla verilmiş ve kandaki konsantrasyonun tedaviden 4 saat sonra 0.124 mg/kg olduğu, 3 gün sonra 0.05 mg/kg 'a düştüğü , 5-7 günlerde hiç tespit edilmediği belirtilmiş. Sütte ise ilk gün 0.146 mg/kg, 3. gün 0.05 mg/kg, 5.gün ise tespit edilemediği saptanmıştır (FAO/WHO 1996).

Yapılan bir diğer çalışmada ise 200 mg klortetrasiklin ihtiva eden solüsyondan meme içi uygulama şeklinde 6 ml enjekte edilmiş ve sütteki seviyesi incelenmiş; 12 saat sonunda 34.01 mg/L olan seviye 48 saat sonunda 1.1 mg/L, 108 saat sonra 0.035mg/L, 120 saat sonra ise <0.03mg/L olarak tespit edilmiştir (FAO/WHO 1996).

Tetrasiklinlerin değişik derecede mide barsak irkiltisine sebep olduğu, bu durumun basit mideli hayvanlarda oldukça belirgin bulantı, kusma, sancı, iştahsızlık ve ishal ile seyrettiği, tetrasiklinlerin anılan etkilerinin süt ürünleri dışındaki besinlerle veya kalsiyum, magnezyum ve alüminyum ihtiva etmeyen antasidlerle

birilikte alınmalarıyla engellenebildiği bildirilmiştir. Oksitetrasiklin MRL sütteki oranı 1996 yılında FAO/WHO tarafından 100µg/kg olarak belirtmiştir. Fakat günlük alınması gereken dozun 0-3µg/kg olduğunu bildirilmiştir. Bunu da teorik olarak 150µg/kg olduğu sonucuna varılmıştır. Bu görüşler çerçevesinde MRL'nin 100µg/kg olduğu ve toplam olarak bu değerin 150µg/kg'ı geçmemesi gerektiği bunun da günlük 1.5 lt süte tekamül ettiği bildirmiştir (FAO/WHO 1996).

1.2 Sütte Antibiyotiklerin Saptanması

Sütteki antibiyotik kalıntıları, antibiyotiklerle tedaviyi gerektiren ve süt sığırlarında en çok görülen mastitis hastalığının tedavisi için antibiyotiklerin hayvanlara parenteral veya oral yolla verilmesiyle ya da doğrudan meme içine enjeksiyon uygulaması sonucu ortaya çıkmaktadır. Çoğu ülkede en yaygın kullanılan antibiyotikler beta laktam grubu antibiyotiklerdir. Ayrıca tetrasiklinler, aminoglikozidler ve kloramfenikol gibi antibiyotikler de süte geçmektedirler. Özellikle son yıllarda sütte antibiyotik mevcudiyeti, kalıntı testlerinin düzenli şekilde gerçekleştirildiği ülkelerde dikkati çekecek ölçülerde azalmış ve inhibitör pozitif çiftlik sütleri sayısının genel olarak %0.1-0.5 düzeylerine indiği bildirilmiştir (Honkanen ve Reybroeck 2000; Güley ve Akbulut 2000).

Avrupa Birliği Komisyonu tarafından yayınlanan 96/23/EC sayılı direktifte sütlerde aranacak maddeler Çizelge 1,4'de verilmiştir. Bu maddelerin aranması Türkiye'de de 19.01.2005 tarih ve 25705 sayılı Resmi gazetede yayımlanan " Canlı hayvanlar ve hayvansal ürünlerde belirli maddeler ile bunların kalıntılarının izlenmesi için alınacak önlemlere dair yönetmelik" çerçevesinde aynen benimsenmiştir (Anon, 2005).

Çizelge 1.4: İçme sütlerinde bulunmaması gereken kalıntı ve kontaminantlar (Anon, 2005).

Grubu	Maddeler
A_6	2377/90 ECC ek IV ve T.C Resmi gazetede yayınlanan 2002/30 No'lu Tebliğde sütte hiçbir seviyede bulunmaması gereken farmakolojik etkili maddeler (Aristolochiatürleri ve bundan hazırlananlar, kloramfenikol, kloroform, kolşsin, dapson, dimetridazol, nitrofuran, furazelidon, ronidazol).
B_1	Sulfanamid ve kinolon grubu da dahil antibiyotikler
B_{2a}	Antelmentikler
B_{2e}	Steroid olmayan ateş düşürücü ilaçlar
B_{3a}	Organik klorlu bileşikler
B_{3b}	Organik fosforlu bileşikler
B_{3c}	Kimyasal elementler
B_{3d}	Mikotoksinler

Birçok ülkede gıdalarda antibiyotiklerin aranması için farklı metotlar geliştirilmiştir. İmmunolojik ve mikrobiyel inhibisyon tarama testleri bu alanda en yaygın kullanılan metotlardır. Ancak bu metotların bazı dezavantajlarının olduğu artık bilinmektedir. Tarama testleri ile sütte antibiyotik tipleri tanımlanamamakta ve resmi olarak güvenlik sınırlarının altındaki antibiyotik miktarlarında da pozitif sonuç vermesi nedeniyle sütlerin gereksiz yere imha edilmesi söz konusu olmaktadır (Schenck ve Callery 1998; Cinguina ve ark. 2003; Shaikh ve Moats, 1993).

Yapılan çalışmalarda ineklerden alınan sütlerin tek tek kalıntı testlerine tabii tutulduklarında sonuçlarda bir çeşitlilik olduğu ve %1-83 oranlarında yanlış pozitif sonuçlar elde edildiği kaydedilmiştir. Somatik hücreler laktoferrin, yağ ve proteinin sütteki derişimleri arttığında genellikle testlerde yanlış pozitif sonuçların oranının arttığı görülmüştür. Ayrıca doğumdan sonraki zamanda yağ ve protein derişimleri artmakta ve bunun yanında kolostrumdaki Ig (immunoglobulin) ve laktoferrin derişimleri yüksek oranda bulunmaktadır. Bu çeşit bakteriyel inhibisyon testinin kolostrum üzerine uygulandığında yüksek düzeyde yanlış pozitif sonuçlarla karşılaşıldığı bildirilmiştir (Andrew, 2000).

Bu nedenlerle sütte antibiyotik kalıntılarının tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için hassas özel ve analitik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Sütte antibiyotiklerin belirlenmesinde kullanılan kalitatif metotlar, X-ray kristalografi, nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopi ve mass spektrometri (MS)'dir. Kantitatif metotlar ise, mikrobiyolojik testler, radyokimyasal testler, radioimmunassay, enzim immunoassay, fluoroimmunoassay ve diğer immunoassay metotlar, spektrofotometrik ve separatif olmayan metotlar ise, likit kromatografisi(LC), gaz kromatografisi (GC), ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek basınçlı likit kromatografisi (HPLC), ve kapillar elektroforezdir (CE) (Stead 2000; Ramirez ve ark. 2003).

Bazı antibiyotiklerin organik çözücülerdeki çözünürlüğünün düşüklüğü, bunların kalıntılarının biyolojik matrikslerden ekstrakte edilmesini ve konsantre edilmesini zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda antibiyotiklerin hemen hepsinin polar olması ve termal olarak stabil ya da hiç stabil olmaması gibi özellikleri, bu bileşiklerin bazı yöntemlerle tayinini zorlaştırmaktadır (Kennedy ve ark. 1998; Di Corcia ve Nazzari 2002). Son yıllarda gündemde kromatografik yöntemlerle kalıntı tayini, sözü edilen bu problemleri taşımaktadır. Sütteki antibiyotik kalıntılarının kromatografik olarak belirlenmesinden önce matriks koekstraktlarının ayrıştırılması gerekmektedir. Antibiyotikler polar oldukları için nonpolar organik çözücülerde ekstraksiyonları uygun olmamaktadır. Antibiyotiklerin sütten ve dokudan ekstraksiyonu için çeşitli ekstraksiyon, deproteinizasyon yöntemleri mevcuttur (Schenck ve Callery 1998; Cinguina ve ark. 2003; Furusawa 1999; White ve ark. 1993; Terade ve Sakabe, 1985).

1.2.1 β-Laktam(Penisilin G) ve Tetrasiklinlerin Saptanması

β-laktam(Penisilin G) antibiyotik grubunun tespiti için uzun yıllardır tarama testleri kullanılmasına rağmen daha hassas ve ispatlayıcı tekniklere ihtiyaç duyulmuştur. Tarama testlerine karşı ortaya çıkarılan GC ve jel elektroforezi kullanılmasına rağmen en yaygın metotlardan birisinin de LC'dir. Penisilinler güçlü UV(Ultraviole) kromoforları vermezler, 210 nm ve 254 nm' de absorbans verirler.

Bu nedenle bu dalga boylarında güçlü absorbans veren süt matriks komponentlerinin ayrılması için LC işleminden önce bir ön temizlik işlemine ihtiyaç duyulur. Bu amaçla β-laktamlar(Penisilin G) için iki aşamalı LC kullanımı uygulanmaktadır. Birincisinde örnek içinde bulunan matriks koekstraktlarının ayrıştırılması, ikincisinde ise antibiyotiğin ekstraksiyonu gerçekleştirilmektedir (Schenck ve Callery 1998; White ve ark. 1993; Terade ve Sakabe, 1985)

Sütte tetrasiklinlerin belirlenmesi için kullanılan metotlardan birinin LC olduğu, bu antibiyotiklerin amfoter özellikte olduğu ve asidik çözeltide 355 nm'de güçlü bir absorbans verdikleri belirtilmektedir. Ancak tetrasiklinlerin silika temelli LC sabit fazında silanol gruplarını bağlamak gibi bir eğiliminin olduğu ve bu problemin mobil faza okzalik asit ilave edilerek veya polistiren divinilbenzen LC kolonları kullanılarak çözülebileceği bildirilmektedir (Schenck ve Callery 1998; Pena ve ark,1999)

1.3. Antibiyotiklerin Süte Geçişini Etkileyen Faktörler

Süt hayvanlarındaki mastitis, antibiyotikler ile tedaviyi gerektiren ve süt sığırlarında en çok görülen hastalık olarak bilinmektedir. Mastitis yanında, antibiyotikler ile tedavi edilen diğer bakteriyel infeksiyonların tedavisinde de, antibiyotik uygulamalarının sütte kalıntı oluşumuna yol açabildiği bildirilmiştir. Antibiyotik uygulamalarında, antibiyotiklerin ortadan kalkma süreci gözardı edildiği zamanlarda, antibiyotik kalıntılarının teknolojik ve ekonomik açıdan önemli problemler ve bu problemlere bağlı olarak ekonomik kayıplara neden oldukları ve söz konusu bu kalıntıları içeren ürünleri tüketen insanların sağlık açısından risk altında oldukları ifade edilmektedir (Honkanen ve Reybroeck 2000; Güley ve Akbulut 2000).

Sistemik hastalıklar ve mastitiste sağmal hayvanlara uygulanan ilaçlar arınma süresi beklenmeden sağılan sütlerde antibiyotik kalıntısı bulunduğu bunun da kaçınılmaz olarak süt ve süt ürünlerinin diğer hayvansal ürünlere göre

antibiyotiklerle kirlenme ihtimalini arttırdığı bildirilmiştir. Beta laktam grubu antibiyotiklerin uygulanan doz miktarlarına göre süte geçme süreleri Çizelge1.5'de görülmektedir (Hessechen ve Bluthgen 1991; Şanlı ve ark. 1991; Yetişmeyen 1995; Akgün 2004;Özer ve Horoz, 1992).

Sütte antibiyotik kalıntılarının % 90'ı meme içi yolla uygulanması sonrası sütün kullanılmama süresine uyulmamasından kaynaklandığı, bu yolla meydana gelen kalıntıların % 60'ının laktasyon dönemi sırasında , % 30'unun kuru dönem mastitis sağaltımları sonucunda oluştuğu bildirilmektedir (Egan ve O'Connor, 1990)

Çizelge 1.5. Beta laktam grubu antibiyotiklerin süte geçme miktarları (Özer ve Horoz 1992).

Antibiyotik	Hayvana verilen miktar	Süre	Süte geçen miktar
Amoksilin	200 mg	12 saat sonra	4,8 μg/mL
Amoksilin	200 mg	24 saat sonra	0,08 μg/mL
Amoksilin	200 mg	36 saat sonra	0,01 μg/mL
Penisilin	200 mg	84 saat sonra	0,007 μg/mL
Penisilin G	2×10^5 IU	12 saat sonra	36,75 μg/mL
Penisilin	1×10^5 IU	12 saat sonra	5 Iμ/mL
Streptomisin	250 mg	84 saat sonra	0,007Iμ/mL
Neomisin	25 mg	84 saat sonra	0,007Iμ/mL

1.3.1 Antibiyotik Çeşidi ve Kullanım Durumu

β-laktam grubu ajanlar laktasyon dönemindeki sığırlarda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kan ve süt arasında antibiyotiklerin dağılımı asidik bazik özelliklerine ve pK_a değerlerine (a= esas madde) bağlı olarak değişmektedir. Temel olarak iyonize olan yağda çözünen antibiyotikler kandan süte çok kısa bir sürede geçmektedir (Honkanen ve Reybroeck 2000; Kınık ve ark. 2002).

Antibiyotik çeşitlerinin memede kalış süreleri ve süte geçen miktarlarının farklı olduğu belirlenmiştir. İnek memesine enjekte edilen antibiyotik türlerinin sütte bulunabilecekleri sürenin incelendiği bir araştırmada bu süre klortetrasiklin için 96

saat, penisilin için 72 ile 92 saat, streptomisin için 72 saat, tetrasiklin için 48 ile 72 saat olarak saptandığı bildirilmiştir (Uysal ve ark. 1995). Haaland ve arkadaşları (1985) sütte antibiyotik kalıntılarının ne kadar süreyle tespit edildiklerini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında, memeye uygulanan antibiyotik dozu yükseldikçe sütlerde antibiyotik konsantrasyonları ile bunların sütte bulunabileceği sürenin uzayacağını ileri sürmüşler ve araştırma sonuçlarını Çizelge1.6'daki gibi bildirmişlerdir.

Çizelge 1.6. Memeye uygulanan antibiyotik dozu ve sütte kalış süresi (Haaland ve arkadaşları 1985)

Antibiyotik	**Doz**	**Atılma süresi (saat)**
Kanamisin	2 x 500 mg	36-48
Kloramfenikol	1 x 1000 mg	72-96
	3 x 1000 mg	96-108
Eritromisin	1 x 2000 mg	84
Ampisilin	1 x 1000 mg	48-72
Tetrasiklin	1 x 500 mg	60
	1 x 3000 mg	72-84

Benzer bir çalışmada penisilinin uygulama şekline göre sütten atılma süreleri incelenmiş ve mastitis vakalarında penisilinin en sık kullanılan uygulama şekli olan meme içi uygulamada sütte en uzun görüldüğü bildirilmiştir. Çizelge 1.7 (Çetin ve Ergün 2000).

Çizelge 1.7. Çeşitli uygulama şekillerinde penisilinin sütle atılması(Çetin ve Ergün 2000).

Uygulanış şekli	Verilen doz	Son uygulamadan sonra atılma süresi
Kas içi	9 milyon I.U	48 saat
Damar içi	10 milyon I.U	< 24
Deri altı	15.000 I.U	20-24 saat
Meme içi	1 milyon I.U	60-108 saat
Uterus içi	2 milyon I.U	< 48

Yapılan çalışmalar hastalıklı memelerin daha fazla antibiyotik tuttuğu, sağlıklı memelere verilen antibiyotiklerin kısa bir süre içerisinde sütle dışarı atıldığını göstermiştir. Nitekim yapılan bir çalışmada, birisi hasta diğeri de sağlıklı olmak üzere iki memenin her birine 426 mg klortetrasiklin enjekte edilmiş ve sonuçta sağlıklı memeden sağılan sütte diğer sağlıklı memeden sağılan süte göre kalıntı miktarının 3 kat daha fazla antibiyotik saptandığı bildirilmiştir. Antibiyotikler süte, memeye enjekte edilmelerinden 10-30 dk, maksimum olarak 2-4 saat sonra karışmaya başlamaktadır. İlk sağımlarda sütlerde çok fazla antibiyotik bulunmasına karşın bunu izleyen sağımlarda konsantrasyon gittikçe azalmaktadır. Yapılan bir çalışmada 100.000 IU penisilin enjekte edilen hayvanların sütlerinde 36 saat sonra 0.5 IU/mL, 48 saat sonra ise daha düşük dozda penisilin düzeyi saptandığı bildirilmiştir (Uysal ve ark. 1995).

Anderson ve ark. (1995) tarafından yapılan çalışmada laktasyondaki Holstein ineklere kas içi ve damar içi yolla oksitetrasiklin verildiğinde 120.saatte oksitetrasiklinin sütteki güvenli düzeyi olan 30 µg/L'nin altına düştüğünü bildirmişlerdir. Çalışmada antibiyotikler kullanıldıktan sonra yasal bekletme süresine uyulmasının zorunluluğu gösterilmiştir.

1.4. Antibiyotik Kalıntısı İçeren Sütlerin Meydana Getirdiği Sorunlar

Antibiyotik içeren sütlerin süt işletmesine kabulünün halk sağlığı yönünden bir tehlike oluştururken işletme için de büyük ekonomik kayıplar meydana getirdiği, süt işletmesinde meydana gelebilecek ekonomik kayıpların sütlerin yoğurt, peynir, gibi starter kültür kullanılan süt ürünleriyle işlenmesi sırasında görüldüğü bildirilmektedir (Akgün, 2004).

1.4.1 İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Organizmanın kalıntıya verdiği yanıt, kaşıntı gibi hafif reaksiyondan anafilaktik şok ve ölüme kadar değişebilmektedir. En sık bildirilen reaksiyonlar alerjik reaksiyonlardır. β-laktam antibiyotikler, aminoglikozidler, sülfonamidler ve birkaç olguda tetrasiklinler, duyarlı insanlarda alerjik reaksiyonlara neden olabilirler. Düşük penisilin(5-10 IU) düzeylerinin bile daha önceden duyarlı hale gelmiş bireylerde alerjik reaksiyon oluşturmaya yeteceğini bildiren epidemiyolojik ve deneysel veriler bulunmaktadır. İnsanlarda oluşan reaksiyonlar; ciltte aşırı derecede şişlik, serum hastalığı, şok ve deri döküntüleri, astım ve ateş gibi reaksiyonlar şeklinde görülmektedir. Bu türden reaksiyonlar çok düşük dozlarda oluştuklarından, duyarlı bireyler gıda maddeleriyle aldıkları düşük miktarlardan bile etkilenebilmektedirler. Bilinen olgu sayısının azlığının sebebinin özellikle yaşlı bireylerde ve küçük çocuklarda meydana gelmesi ve bunların göz ardı edilmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Paige ve ark., 1997).

Bakterilerde protein sentezini engelleyerek etki gösteren oksitetrasiklin, kloramfenikol gibi antibiyotiklerin memeli lenfositlerinde protein sentezini engelleyerek bağışıklık sistemini baskılanmasına neden olduğu, uzun süre antibiyotik kalıntısı içeren gıdaların tüketimine bağlı olarak insanlarda süper infeksiyon tehlikesi ortaya çıktığı bildirilmiştir (Şanlı ve ark. 1991;Schenck ve Callery 1998)

Antibiyotik kalıntısı içeren süt ve süt ürünlerinin uzun süreli tüketimi sonucu vücudun bağışıklık sisteminin zayıflaması ile özellikle küçük çocukların ve bebeklerde beslenmesinde önemli yer tutan sütlerde bu kalıntıların varlığı sağlık problemlerine neden olduğu bildirilmektedir. Sindirim kanalından hızlı emilen tetrasiklinlerin transplasental geçişi de kolay olmaktadır. Gelişen kemiklerde ve diş yapılarında şelasyon ile kalsiyuma sıkıca bağlanmaktadır. Bunun sonucunda tetrasiklinler fetusta iskelet sistemi anomalileri, dişlerde diskolorasyon ve muhtemelen diş minelerinde hipoplazi meydana getirmektedir. Dişlerdeki hasarın gebeliğin 4. ayı ile 7-8'inci yaşlar arasında görüldüğü bildirilmektedir. Besin maddelerinde bulunacak 1 ppm düzeyindeki tetrasiklin kalıntısı insanlarda istenmeyen etkilere yol açmayabilse de 5-7 ppm'i tehlikeli olabilmektedir. Gebelerde ve yetişkinlerde ise sinirsel bozukluklara, immuno-toksisiteye ve karaciğer toksikasyonuna yol açmaktadır. Bunun yanısıra akut karaciğer yağlanması ve pankreatit eğilimini arttırdığını bildiren araştırmalar mevcuttur. Fetal uzun kemiklerde geçici büyüme inhibisyonu yaptığı tespit edilmiştir. Anne ve fetus üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı, gebelik esnasında tetrasiklinlerin ve bunların kalıntılarını içeren gıdaların tüketiminin sakıncalı olduğu bildirilmektedir (Şanlı ve ark. 1991; Imerman ve ark. 1996; Kaya ve ark.1992; Dubois ve ark. 2001; Yalman 1993).

Penisilin türevi antibiyotik kalıntılarının yol açabileceği en önemli sakıncalar bu tür gıdayı tüketen kişilerde hafif bir deri tepkimesinden başlayarak anafilaktik şoktan ölüme kadar gidebilen ilaç alerjisi olduğu bildirilmektedir. Penisilin tipi ilaç kalıntısı ihtiva eden besinlerin yenilmesinden sonra alerjik etki olasılığının, bu sebeple hiçbir zaman göz ardı edilmemesi gerektiği, toplumdaki kişilerin yaklaşık % 10'unun penisiline duyarlılık gösterdikleri bildirilmektedir (Ormerod, 1987; Lindemayr, 1981; Kanny, 1994; Leon, 1992; Dewdney, 1991).

Lindemayr ve ark(1981), Penisiline alerjisi olan 9 gönüllü hastaya kesimden önce terapötik dozda penisilin uygulanmış domuzun etini vermişler ve hastalarda reaksiyonların tekrarlandığını görmüşler, böylelikle penisilin kalıntısı içeren gıdaların alerjiden şoka kadar etki yapabileceklerini bildirmişlerdir.

Ormerod ve ark(1987), kliniğe gelen 50 ürtiker hastasını penisiline alerji yönünden test etmişler, 4'ünün 0.1 U/mL penisilin içeren sütlere alerji gösterdiklerini bildirmişlerdir ve veteriner hekimlikte kullanılan antibiyotiklere dikkat çekmişlerdir.

Kanny ve ark.(1994), Fransa'nın Nancy şehrinde gıdalardaki penisilin kalıntısına bağlı kaynaklanan anafilaktik şokun 64 yaşında bir bayanda gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Hastanın domuz eti ve biftek yemesinden sonra şokun oluştuğunu ve hastanın Penislin G'ye 1 IU/mL seviyesinde duyarlılığının olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar yaptıkları deneysel çalışmada 20IU/mL penisilin kalıntısı bulunan sütün nabzı düşürdüğünü ve kan basıncını arttırdığını göstermişler, penisilin kalıntısı içeren gıdaların bu tür hastalarda ciddi riskler oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Rudzki ve ark. (1994), 228 astım hastasının % 86.66'sına önceleri alerji teşhisi konulmuş ve bu alerjik durumun muhtemelen penisilin ve sülfanamid içeren süt, yumurta, balık ve çikolatadan kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Duyarlı kişilerde 1 mikrogram veya daha az miktardaki penisilinin alerjik tepkimelere yol açabileceği dikkate alınırsa, penisilinlerle bulaşık besinlerin taşıdıkları önem kolayca değerlendirilebilir. Bundan dolayı insanların günde 100-200g et veya 100–500 ml süt tüketecekleri ve 1 ünite ya da 0.6 mikrogram penisilinin alerjik tepkimelere yol açabileceği göz önüne alınarak ette, 0,01-0,005 ünite/gram (veya 0,006-0,003 mikrogram/gram) miktardaki penisilin kalıntısı, tolerans düzeyi olarak belirlenmiştir. Yine hayvansal kaynaklı besin maddelerinde ampisilin düzeyi 0,005 ppm'le sınırlandırılmıştır (Chagonda ve Noikuwara, 1989; İmerman ve ark. 1996; Baydan ve ark.1997; Dubois ve ark. 2001; Cinguina ve ark. 2003).

İnsanların bağırsaklarındaki bakteri topluluğunda 400-500'den fazla tür olduğu bunların >%90 obligat anaerobik 30 türde " özellikle *Bacteroides, Fusobacterium, Eubacterium, Clostridium, Ruminococcus, Peptostreptococcus,*

Peptococcus olmak üzere" bulunduğu ve gıdalardaki antibiyotik kalıntılarının bunlar arasındaki ekolojik dengeyi bozabildiği bildirilmiştir. Bağırsak içeriğinde $1x10^{11-13}$/g bakteri bulunmakta olup, sindirime yardımcı olmakta, patojen mikroorganizmaların üremelerine ve girişine de engel olmaktadırlar.

Kalıntı halinde en çok 1.5 mg/60 kg c.a/gün miktarda antibiyotik alınmasına izin verilmektedir. Bu miktar bir insanın günde 1.5 kg gıda tüketeceği, 1 kg gıdada bulunacak <1 mg antibiyotiğin de mikrobiyolojik bir zarar meydana getirmeyeceği esasına dayanmaktadır. Antibiyotiklerin günlük alım miktarları ve tolerans düzeylerinin belirlenmesinde bu durum göz önüne alınmaktadır Çizelge 1.8(Carman ve ark. 2005; FAO/WHO 41/6).

Çizelge 1.8 Bu çalışmada kullanılan antibiyotiklerin günlük gıdayla alınmasına izin verilen tolerans düzeyleri(FAO/WHO 41/6)

Antibiyotik	**Günlük alınmasına izin verilen tolerans düzeyi**
Penisilin G	30µg/kişi
Oksitetrasiklin	3µg/c.a/gün
Tetrasiklin	3µg/c.a/gün
Klortetrasiklin	3µg/c.a/gün

Tannock (1995), tetrasiklinlerin fekal flora üzerinde orta düzeyde etkili olduğunu, Hoverstat (1985) ise çok küçük ya da hiç etkisinin olmadığını bildirmiştir.

Finegold ve ark.(1983), tetrasiklinlerin *Escherichia coli*'nin gelişim sürecine herhangi bir etkisinin olmadığını, koliformlarda dirençliliği değiştirmediği ya da arttığı bildirilmiştir. Kalıntı miktarının düzeyine bağlı olarak enterokok bakteri yükü sayısının arttığı, azaldığı bazen de tamamen yok olabileceği bildirilmiştir. Laktobasillerde klortetrasikline dirençliliğin benzer sebeplerden dolayı arttığı veya azaldığı, tetrasiklinlerin Bacteroides ve Clostridium türlerinin üzerine etkili olduğu, çoğunluklada inhibe ettiği bildirilmiştir.

Carman ve ark.(2005), yaptıkları bir çalışmada 150 mg/kişi/gün dozda tetrasilin uygulanan hastalardan izole edilen *E.coli* izolatlarının dirençlilik oranını

%70 olarak saptamışlardır. Düşük dozlarda 1.5 mg/kişi/gün dozda tetrasiklin uygulanan hastalardan izole edilen *E.coli* izolatlarındaki dirençlilik oranlarının pek değişmediğini saptamışlardır. Fakat izole ettikleri *E.coli* izolatlarının 8µg/mL tetrasiklin ile muamele edilmesiyle daha önce hiç dirençlilik göstermeyen suşlarda dirençlilik oranının %15 arttığını tespit etmişlerdir.

Voltanen ve ark.(1976), çeşitli dozlarda tetrasiklin uyguladığı hastalarda tedaviden önce % 27 olan koliform dirençliliğinin tedavi sonrası bu oranın % 80'e çıktığını görmüştür.

Tancrede ve Barakat(1987), Anaerobların dirençliliği üzerinde 1500 izolat çalışmışlar ve bir değişiklik görülmediğini, günde 2 mg/gün dozda tetrasiklinin hiçbir etki yapmadığını, fakat dozun arttırıldığında 20mg/gün enterobakterilerde dirençliliğin arttığını görmüşlerdir. Tetrasiklin terapötik dozda kullanıldığında *E.coli*'de dirençliliğin arttığını son uygulama zamanından sonra dirençliliğin düşmeye başladığını bildirmişlerdir.

1.4.2 Antibiyotik kalıntılarının süt ürünlerinde yarattığı sorunlar

Fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür kullanılan peynir ve diğer süt ürünlerinin başarılı bir şekilde üretilmesi, starter kültürlerin aktivitesine bağlı olmaktadır. Starter bakterilerin gelişimi inhibe edildiği takdirde, ürün kalitesi istenen şekilde olmadığı ve fermente süt ürünlerinde ve peynirlerde kullanılan starter kültürlerin, antibiyotik kalıntılarının çok düşük konsantrasyonlarına bile çok hassas oldukları bildirilmektedir. Fermente süt ürünlerinde antibiyotiklerin etkisi, yavaş ya da inhibe edilmiş laktik asit ve aroma oluşumunda azalma, yapıda gelişememe olarak kendini göstermektedir. Özellikle peynirde birçok kusurların meydana gelmesine sebep olmaktadır. Bunlar kötü tat oluşumu, istenmeyen tekstür oluşumu, arzu edilmeyen şekilde gözenek oluşumu ve istenmeyen bütirik asit fermantasyonlarının

meydana gelmesi şeklinde olduğu bildirilmektedir (Akgün, 2004; Marya-Makinen, 1995; Güley ve Akbulut 2000).

Penisilinler, süt endüstrisinde üretim sürecinde kullanılan bakterilerin güçlü inhibitörleridir. Sütte bulunabilecek 0.01 IU/mL penisilin miktarının asit üretimini geciktirdiği ve starter kültürlerin üremesini büyük ölçüde engellediği bildirilmiştir. Süt ürünlerinin güvenilir olması ve kabul edilebilir olması için penisilin kalıntılarının sütte 0.005 IU'den fazla bulunmaması gerektiği bildirilmiştir (EMEA, 2000; FAO/WHO 1996).

Antibiyotik kalıntıları aynı zamanda starter olmayan laktik asit bakterileri üzerinde de etkili olmakta ve bu bakterilerin gelişimini inhibe etmekte, dolayısıyla üründe, özellikle çiğ üretilen yöresel peynirlerde daha az tat ve aroma oluşumuna sebep olmaktadırlar (Çizelge 1.9) (Marya-Makinen 1995; Demirci 2000; Güley ve Akbulut 2000)

Çizelge1.9.Düşük konsantrasyonlardaki penisilin ve tetrasiklinin Edam ve Emmental peynirlerinin kalitesi üzerine etkileri (Marya-Makinen 1995).

Peynir kalitesi		
Antibiyotik	**Edam**	**Emmental**
Penisilin		
0.003 IU/mL	Kusur yok	Kusur yok
0.005 IU/mL	Tatsız	Kötü tat, normal olmayan gözenek oluşumu
0.008 IU/mL	Acı tat, düzgün olmayan yapı	Çok kötü tat, bütirik asit ferm.
0.1 IU/mL	Çok kötü tat, düzgün olmayan yapı	Test edilmedi
Tetrasiklin		
0.3 g/mL	Tatsız	Kötü tat
0.7 g/mL	Tatsız, yüzeyde aşırı bir koku oluşumu	Test edilmedi

İçerisinde 0.02 IU/mL oranında penisilin bulunan süt, üretimde kullanıldığında, tereyağında aroma ve lezzet bozukluğuna, peynirde ise asiditenin geç şekillenmesi ve anormal fermantasyona neden olduğu bildirilmiş, starter kültürlerin üremesini

durduran antibiyotiklerin en düşük miktarları Çizelge 1.10'da gösterilmiştir (Tekinşen ve Atasever,1994)

Çizelge 1.10 Yoğurt bakterilerinin çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdikleri hassasiyet (Tekinşen ve Atasever,1994)

Antibiyotik	***S. thermophilus***	***L. delbrueckii subsp. bulgaricus***	**Karışık kültür**
Penisilin	0,004-0,01 IU/mL	0,02-0,1 IU/mL	0,01 IU/mL
Streptomisin	0,380 IU/mL	0,380 IU/mL	1,00 IU/mL
Tetrasiklin	0,130-0,5 μg	0,34-2,0 μg	1,00 IU/mL
Klortetrasiklin	0,06-1,0 μg	0,06-1,0 μg	0,10 IU/mL
Oksitetrasiklin	0,04 IU/mL	0,7 IU/mL	0,40 IU/mL
Basitrasin	0,04-0,12 IU/mL	0,04-0,12 IU/mL	0,04 IU/mL
Eritromisin	0,30-1,30 μg	0,07-1,300 μg	0,10 IU/mL
Kloramfenikol	0,80-13,0 μg	0,80-13,0 μg	0,50 IU/mL

Yoğurt teknolojisinde *Streptococcus thermophilus* 0.01 IU/mL penisiline duyarlı olduğu için asit oluşumu meydana gelmediğinden yoğurt oluşamamaktadır. Peynirde ise propiyonik asit bakterilerinden *Propionibacterium shermanii'nin* gelişimini engellenmesi ile kuvvetli protein parçalanmasını ve gözenek oluşumunu engelleyerek düşük peynir kalitesine sebep olduğu bildirilmiştir. Tereyağında ise olgunlaşma sırasında sitrik asidinden tereyağı aroma maddesi olan diasetili meydana getiren tereyağ starter kültürleri olan *Lactococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp.'nin de penisiline duyarlı olduğu gözlenmiş ve diasetilin oluşmasını engellediği bildirilmiştir (Demirci, 2000; White ve ark. 1993).

Lim ve ark. (1995) yaptıkları bir çalışmada, *L. acidophilus, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L. casei* ve *S. thermophilus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere hassasiyetlerini test etmişler, araştırma sonucunda bütün suşların en fazla penisilin G'ye ardından, basitrasin, eritromisin, linkomisin'e duyarlılık gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Sütteki inhibitör madde konsantrasyonunun 3.12 μg/mL' den fazla olması halinde, bütün suşların gelişmesinin tamamen inhibe olacağı da belirtilmiştir (Tekinşen, 2000).

Hassas bir süt ürünü olan süt tozu üzerinde yapılan bir çalışmanın sonucunda ise, sütte bulunan antibiyotik kalıntılarının miktarında herhangi bir değişiklik olmaksızın doğrudan süt tozuna geçtiği, kurutma işleminin antibiyotik kalıntılarını etkilemediği belirtilmiştir (Diserens ve ark. 1995; Güley ve Akbulut 2000)

1.4.3 Dirençli Suşların Gelişimi

Antibiyotiklerin yaygın kullanımının yol açtığı problemlerin ilki hayvansal besin maddelerinde ilaç kalıntıları ve güvenliği, diğeri hayvanlarda kullanılmaları sonucu duyarlı bakteri türleri arasında dirençli suşların ortaya çıkmasıdır. Bu durum hayvansal gıdalarla alınan antibiyotik kalıntılarının insanlarda antibiyotiklere direnç konusunda potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Antibiyotikler yeme düşük düzeyde katılarak sürekli olarak veya uzun etkili müstahzarlar paranteral yolla kullanılmaktadır. Özellikle kas içi olarak, bir doku deposu oluşturacak biçimde yüksek dozlarda uygulanması ve gıdalarda kalıntıların artması, buna orantılı olarak gıdalarda patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç kazanmasına neden olmaktadır. Bu durum antibiyotiklere karşı dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkmasını hazırlayan ve kolaylaştıran en önemli faktörler arasındadır. Antibiyotik kullanım sonucu hayvansal gıdalara bulaşmasını takiben, dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasının halk sağlığı açısından önem arz ettiği, hastalıkların sağaltımı veya önlenmesinde mevcut antibiyotiklerin yetersiz kaldıkları veya istenen ölçüde başarılı olamadıkları bildirilmiştir (Kaya ve ark.1992; Claycamp ve Hooberman,2004).

1997 yılında ABD'nin Nebraska eyaletinde 19 çocuğun şiddetli ishal, ateş, kusma şikayetleri ile başlayan ve ölümüyle sonuçlanan vakaya Centers for Diseas Center(CDC) *Salmonella typhimurium* DT104'den bubunda içtikleri çikolatalı sütten kaynaklandığını ve bu suşun ampisilin ve tetrasikline dirençli olduğu bildirilmiştir (Anon, 2002).

Schlegova ve ark(2002) , sütlerden izole ettikleri *Staphylococcus aureus, E. coli, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium*, ve *Bacillus cereus* suşlarının antibiyotiklere olan dirençliliklerini incelemişler. Elde edilen 31 *S. aureus* suşunun 7'sinin tetrasikline, 11'inin penisiline dirençli olduklarını, 26 *E. coli* suşunun 7'sinin tetrasikline dirençli olduklarını, 80 *E. faecalis* suşunun 46'sının tetrasikline, 11 *E. faecium* suşunun 4'ünün tetrasikline dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Temmerman ve ark. (2002), Avrupa'daki toplam 55 probiotik ürünlerinden izole ettikleri 187 izolatın antibiyotik duyarlılıklarını incelemişler % 79'unun kanamisine, % 65'inin vankomisine, % 28'inin Penisilin G'ye, % 26'sının tetrasikline, % 16'sının eritromisine ve % 11'inin kloramfenikole dirençli olduklarını bulmuşlardır.

Özellikle son yıllarda hastane infeksiyonları arasında ilk sıralarda yer alan *S. aureus*'a karşı artan bir penisilin direnci gelişimi bildirilmektedir. Penisiline dirençli stafilokoklar için penisilinaza dirençli metisilin, nafsalin, gibi penisilinler geliştirilmiştir. Fakat stafilokoklarda 1960'lı yılların başından itibaren metisiline dirençli suşlar bildirilmeye başlanmıştır. Stafilokoklarda metisilin direnci kromozomal veya kazanılmış plazmidal olabilmektedir. Kromozomal metisilin direnci farklı bir penisilin bağlayan proteinin (PBP) sentezlenmesi sonucu gelişmektedir. *PBP 2a* olarak isimlendirilen bu enzimin β-laktam antibiyotiklere afinitesi düşüktür. Penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) çoğu tüm β-laktam antibiyotiklerle bloke edilmesine rağmen, *PBP 2a* β-laktam'ın antibiyotiklere bağlanmadığı bildirilmiştir. Stafilokoklarda düşük affiniteli *PBP 2a* sentezi sonucu gelişen metisilin direnci *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* geninin veya *PBP 2a*'nın moleküler yöntemlerle belirlenmesi mümkündür. Fakat rutin amaçla yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle metisiline dirençli stafilokoklar diğer β-laktam ve β-laktamaz inhibitörlü antibiyotikler ve karbapenemlere dirençli kabul edilmektedir (Gürler, 2003).

Antibiyotiğe dirençli suşlar çiğ sütten yapılan peynirlerde de gözlemlenmiştir. Nitekim çeşitli peynirler üzerinde yapılan çalışmalarda, antibiyotiğe dirençli

enterokoklar izole edilebilmiş ve antibiyotiklere dirençli böyle suşların yayılması ve hatta insanlara bulaşmasının önemli sorunlara neden olduğu bildirilmiştir (Perreten ve Teuber 1995).

Herreros ve ark (2005), Armada peynirlerinden 31 adet laktik asit bakterisi izole ettiklerini ve en fazla izole ettikleri 18 suşun (9 *L. lactis*, 2 *L. mesenteroides,* 2 *L. Plantarum*, 2 *L. Brevis,* 3 *L. Casei*) 15 farklı antibiyotiğe dirençliliklerini incelemişlerdir. Çalışmada 17 suşun nitrofurantoine, 15 suşun teikoplaine, 14 suşun cefoksine, vankomisin, siprofloksasine, 9 suşun (3 *L. lactis*, 2 *L. mesenteroides*, 2 *L. plantarum*, 2 *L.casei*) tetrasikline dirençli olduğunu saptamışlardır.

Huys ve ark. (2004), Avrupa'daki peynirlerden izole ettikleri enterokok izolatlarının tetrasikline dirençlilik gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Delgado ve ark(2002), 5 farklı Artisanal peynirinden izole ettikleri 29 laktokok suşunun basitrasin, sefalotin, klindamisin, streptomisin ve tetrasiklinlere dirençli olduklarını ortaya koymuşlardır.

Gündoğan ve Çitak (2005), çiğ süt, pastörize süt ve dondurmadan oluşan 180 adet örneği *S. aureus* yönünden araştırmışlar ve 110 örnekte *S. aureus* saptamışlardır. Elde ettikleri izolatların antibiyotiklere olan dirençliliğini araştırmışlar ve 106 *S. aureus* izolatın ve % 99'unun basitrasin'e, % 97.2'sinin metisilin'e, % 96.3'ünün penisilin G'ye dirençli olduklarını tespit etmişlerdir.

Canzek ve ark. (2005), Tolminc peynirlerinden 90 enterokok izole etmişler ve çeşitli antibiyotiklere dirençli olduklarını bunlardan birinin de penisilin olduğunu bildirmişlerdir.

Umoh ve ark. (1990), süt ve süt ürünlerinde izole ettikleri 248 stafilokok izolatının çeşitli antibiyotiklere dirençliliklerini araştırmışlar, % 32.3'ünün sulfafurazole, % 30.2'sinin penisilin G'ye, % 25.4'ünün ampisiline, % 9.3'ünün

kloksasiline, % 7.7'sinin tetrasikline, % 6.9'unun streptomisine, % 5.6'sının eritromisine ve % 4.8'inin kloramfenikole dirençli olduklarını tespit etmişlerdir.

Aslim ve Beyatlı (2004), yoğurtlardan izole ettikleri *S. thermophilus* izolatlarının % 64'ünün penisilin G'ye % 88'inin tetrasikline dirençli olduklarını saptamışlardır.

Direnç genlerinin özellikle transpozonlarca taşındıkları anlaşılmış bu tip aktarım olaylarının düşük yoğunluklu antibiyotik varlığında hızlandığı ve antibiyotik ortamdan çekilince kaybolduğu veya azaldığı bildirilmektedir (Tuncer 2000; Carman ve ark.2005).

Türkiye'de ve dünyada yapılan çeşitli araştırmalarla da mastitisli ineklerden, süt ve süt ürünlerinden izole edilen patojen mikroorganizma suşlarının pek çok antibiyotiğe değişen oranlarda dirençlilik gösterdiği ortaya konulmuştur (Ak, 2000; Akan ve ark. 2001; Uraz ve Öncül 2003; Uçan ve Aslan 2002; Sezen ve ark. 1986; Hadimli ve ark 2001; Ombui ve ark. 2000; Picozzi ve ark. 2005; Murinda ve ark. 2005; Dontorou ve ark. 2003; Araya ve ark (2005).

Ombui ve ark (2000), sütten izole ettikleri 75 *S. aureus* suşunun % 66.7'sinin penisiline dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Picozzi ve ark (2005) çiğ sütten izole ettikleri *E. coli* O157 suşlarının 11 antibiyotiğe dirençliliklerini incelemişler %50 oranında tetrasiklin ve sülfonamide, %33 oranında da streptomisine dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Dontorou ve ark (2003), *E.coli* O157:H7'yi hayvansal kaynaklı 600 örnekte; çiğ inek sütü, koyun sütü, keçi sütü, çiğ kıyma, hamburger, domuz sucuğu, domuz kokorecinde araştırmışlardır. Sonuçta 100 koyun sütünde 1 adet, 75 sucukta 1 adet, domuz kokoreçinde 1 adet *E.coli* O157:H7 tespit etmişlerdir. Elde edilen 3 *E.coli* O157:H7 suşunda tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, nalidixic asit, nurfloksasin, streptomisin, sulfamethoxazole-trimethoprim'e direnç saptamışlardır.

Chingwaru ve ark. (2003), kırmızı et, süt ve tavuk etinden 1467 enterokok izole etmişlerdir. En fazla % 46.1 *E.faecalis* ve % 29 *E. faecium* türlerine rastlanmış ve elde edilen enterokok izolatlarının başta ampisilin (% 97), vankomisin, teicoplanin, tetrasiklin ve cephalotine karşı dirençli olduklarını tespit etmişlerdir.

Araya ve ark. (2005), pastörize edilmemiş süt örneklerinden izole ettikleri 48 enterokok izolatının tetrasiklin ve kloramfenikole olan dirençlilik oranının % 50'den az olduğunu bildirmişlerdir.

Murinda ve ark.(2005), mastitisli ineklerden 14 , inek fekal örneklerinden 9 ve sütten 1 tane olmak üzere 24 *E.coli* izolasyonu gerçekleştirmişler ve bu izolatların başta sulfamethoxazole olmak üzere streptomisin ve tetrasikline dirençli olduklarını saptamışlardır.

Akan ve ark.(2001), yaptıkları bir çalışmada inek mastitislerinden izole edilen 82 stafilokok suşunun 49'unun penislin G'ye dirençli olduklarını saptamışlardır.

Ak (2000), yaptığı bir çalışmada izole edilen *S. aureus* suşlarının tamamının penisiline dirençli olduğunu saptamıştır.

Uraz ve Öncül (2003), yaptıkları bir çalışmada 179 izolatın 136'sının β-laktamaz pozitif olduğunu tespit etmişlerdir.

Uçan ve Aslan (20029, mastitisli ineklerden izole ettikleri 75 adet *S. aureus*'tan 49'unun 6 adet *S. intermedius* 2'sinin β- laktamaz pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

Sezen ve ark. (1986), Konya bölgesinde yaptıkları bir çalışmada mastitisli ineklerden izole ettikleri 19 *S. aureus* suşunun tamamında β-laktamaz üretimini belirlemişlerdir.

Hadimli ve ark.(2001), mastitisli süt ineklerinden izole ettikleri 66 stafilokok suşunun penisiline dirençli olduklarını tespit etmişlerdir.

Bakterilerde gelişen direnç, mastitislerin sağaltımında başarısızlığa ekonomik kayba ve halk sağlığı sorunlarının gelişmesine yol açmaktadır. Bu nedenle mastitis sağaltımının, mutlaka antibiyogram sonuçlarına dayandırılması ve direnç gelişen antibiyotiğin kullanımından kaçınılması gerekmektedir.

1.5. Mevzuat

Gıdalarda antibiyotik kalıntılarının sakıncaları anlaşıldıktan sonra İngiltere, ABD ve Batı Avrupa ülkeleri ile Dünya Sağlık Örgütü(W.H.O), Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) konu üzerinde titizlikle durmuşlardır. İlk kez Swann başkanlığında oluşturulan bir komisyon, 1969 da tamamlanan çalışma raporuyla hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotik ilaçların yarattığı çok yönlü sağlık sakıncalarını gündeme almışlardır (Önal ve ark. 1993).

Hayvansal üretimde kullanılan ilaçlar için kontrol mekanizmaları geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapan birçok uluslararası organizasyon bulunmaktadır. Söz konusu mekanizmalar, ilacın dağıtımının kontrolünü, kullanımını, güvenli kalıntı miktarı seviyelerinin belirlenmesi ve kullanılan kalıntı belirleme tekniklerini içermektedir (Mitchel ve ark. 1998; Güley ve Akbulut 2000).

İlaçların kalıntı ve katkıları konusunda uluslararası düzeyde çalışma yapan başlıca organizasyonlar; Ana hatları CCRVD(Codex Committe on Residue of Veterinary Drugs in Food) tarafından JECFA (Joint WHO/FAO Expert Committe on Food Additives)'nın bilimsel tavsiyeleri esas alınarak belirlenmiş Kodeks Alimentarius Komisyonu, EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)'dır(Mitchel ve ark. 1998; Güley ve Akbulut 2000).

FAO/WHO' nun ortak bir girişimi olan Kodeks Alimentarius, 1985'ten beri gıdalarda bulunabilen kalıntılar için çeşitli standartlar hazırlamaktadır. Bu standartlarda antibiyotiklerin gıda maddelerinde maksimum kalıntı düzeyleri (MRL) şeklinde önerilen miktarları belirtilmekte ve FAO/WHO ortak komitesince gerçekleştirilen bilimsel çalışmalara dayandırılmaktadır (Honkanen ve Reybroeck 2000; Kınık ve ark. 2002).

Dünya sağlık teşkilatınca (WHO), Avrupa Birliği direktifleri ve Türk gıda kodeksine (2005) göre antibiyotik tedavisi gören ineklerin sütlerinin satışa sunulması, süt ürünlerinin üretiminde kullanılması ve buzağıya verilmesi yasaklanmıştır. Çizelge (1.11)'de Türk Gıda Kodeksinde (2005) Yönetmeliğindeki "Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner ilaçları maksimum kalıntı limitleri tebliği, kodeks alimentarius, Avrupa Birliği 2377/90 ECC ek IV sayılı direktifi, Avrupa Birliği (EU) Gıda ve İlaç Kuruluşu (USFDA) tarafından belirlenen ve bu çalışmada kullanılan bazı antibiyotiklerin sütte bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı limitleri (Maksimum Residue Limit (MRL)) belirtilmiştir.

Çizelge 1.11. Bazı antibiyotiklerin EU/Kodeksine(2377/90) ve Türk gıda kodeksine (2005) göre sütteki MRL seviyeleri.

Antibiyotikler	**Maksimum kalıntı seviyesi (ppb)**
Penisilin G	4
Klortetrasiklin	100
Oksitetrasiklin	100
Tetrasiklin	100

1.6.Korunma ve Kontrol

Türkiye'de veteriner hekimlikte 1991 yılı sonu itibariyle ruhsatlandırılıp üretimi yapılan 350'den fazla ilacın 100'den fazlasını antibiyotik ve benzeri etkili ilaç müstahzarları oluşturmaktadır (Kaya ve ark.1992).

Hayvanlara formül belgelerinde belirtilenden fazla miktarda ilaç uygulaması, ilaç uygulamasının durdurulmasını takiben varsa her madde için belirlenmiş olan yasal bekletme süresine uyulmaması, ambar, depo veya yem fabrikalarında ilaçlı yem artıklarının kalması, gıdalarda ilaç kalıntılarının en önemli sebepleri arasında değerlendirilmektedir (Kaya ve ark.1992).

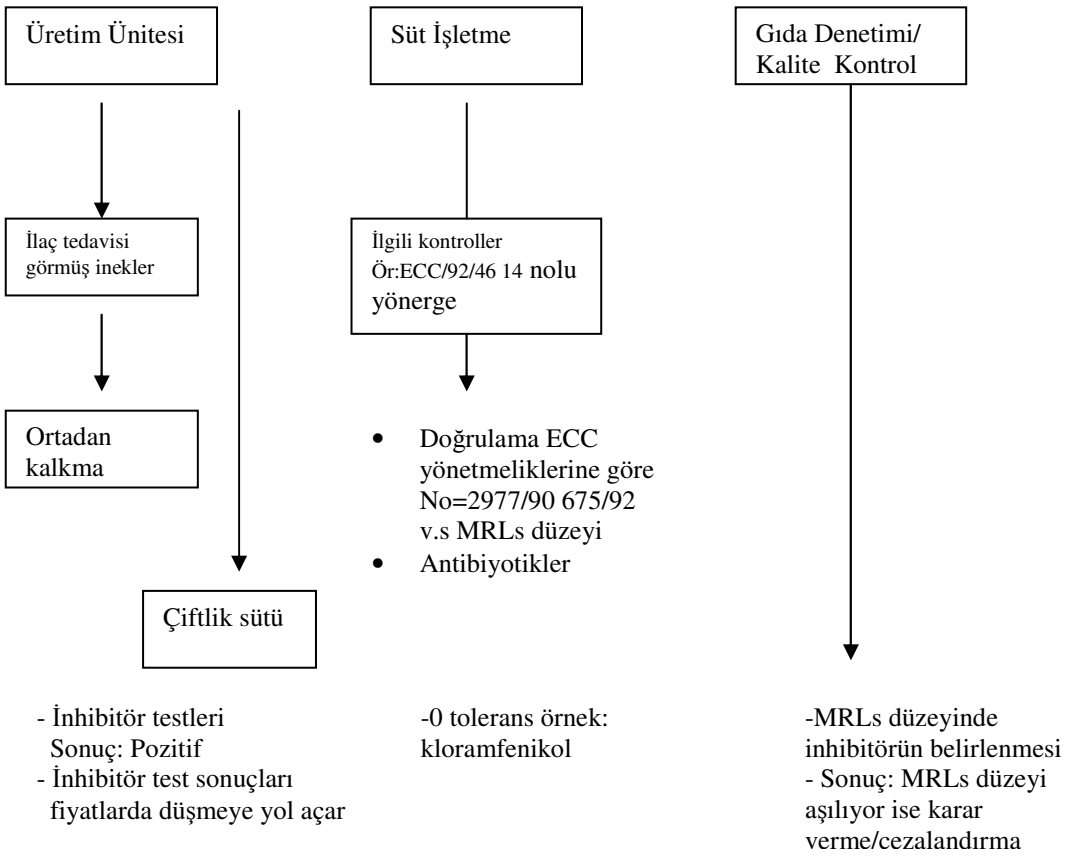
Veteriner hekimlikte antibiyotik kullanımı sonucu kasaplık hayvanların et ve iç organları ile yumurta ve sütteki antibiyotik kalıntıları, insanlarda toksik, alerjik reaksiyonların ortaya çıkmasının yanı sıra, mikroorganizmalarda direnç gelişimi gibi önemli etkilerin meydan gelmesine neden olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin insan hekimliğinde kullanılan antibiyotiklerle aynı olmaması ve dolayısıyla insan hekimliğinde kullanılan antibiyotiklere karşı çapraz rezistans oluşmaması, uygulanan antibiyotiklerin rezorbe edilir olmaması veya yalnızca düşük seviyede rezorbe edilebilir olması gerektiği belirtilmektedir. Gıda güvenliğinin sağlanması ve halk sağlığının korunması amacıyla söz konusu maddelerin uygulanması halinde, antibiyotik uygulandıktan sonra gerekli bekleme süresine dikkat edilmeli ve kesimden sonra ette (kırmızı, kanatlı, balık) veya süt, yumurta, bal gibi hayvansal besinlerde bulunabilecek en yüksek kalıntı miktarlarının (MRL) aşılmasına izin verilmemesi gerektiği bildirilmektedir. Bu nedenle Avrupa'da 1975 yılından itibaren β-laktamların gelişmeyi artırıcı olarak kullanımı yasaklandığı bildirilmiştir. Yine AB, 1988 ve 1994 yıllarında insan tedavisinde kullanılan antibiyotikleri ile benzer veya yakın ilişkili antibiyotiklerden avopersin (glikopeptid), tiylosin, spiramisin (makrolid), virginamisin (streptogramin), ve Zn basitrasin (polipeptid) ile muhtemel toksikolojik etkilerinden dolayı karbadoks ve olakindoks'un (kinokslin) veteriner hekimlikte kullanımının yasaklandığı, bu önemli

halk sağlığı sorununun kontrolü için uluslararası düzenlemelere titizlikle uyulması gerektiği bildirilmiştir (Erol 2004; Teale 2002; Anon 1988; Schwarz ve ark. 2001).

Mastitisli süt sığırlarının tedavisi sonucunda antibiyotik kalıntılarının ve inhibitörlerinin süte geçmesi halen süt endüstrisi için önemli bir problemdir. Hem teknolojik hem de toksikolojik güvenliği sağlamak amacıyla antibiyotik maddelerin belirlenmesi için entegre belirleme yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla MRL ve diğer tolerans düzeylerine ilişkin olarak antibiyotik ve inhibitör maddelerin belirlenebilmesi için farklı test yöntemleri ortaya konulmuş, süt üreticileri, süt endüstrisi ve gıda denetçilerinin sorumlulukları paylaştırılmıştır. Ancak inhibitör madde içermeyen süt üretiminin gerçekleşmesi halen üreticilerin eğitilmesine dayanan önemli bir konu olarak kabul edilmektedir (Honkanen ve Reybroeck 2000)

Tehlike analizi kritik kontrol noktaları (HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)) yönteminin antibiyotik kalıntılarının süte bulaşmalarının önlenmesinde kullanımı gerekmektedir. Bu amaçla antibiyotiklerin sadece veteriner hekim reçetesiyle satılması ve sorumluluğunda kullanılması gerekmektedir. Her bir veteriner bazlı antibiyotiğin ortadan kalkma periyodu belirlenmeli ve bu süreç tam olarak dikkate alınmalı ve hayvan üreticileri de bu sürece mutlak uyması farklı sistemlerin kombine edildiği entegre bir sistemde ve ilgili tüm bölümlerin sorumluları ve sorumlulukları belirlenmesi, bu nedenle süt üretimi, süt işleme, kalite kontrol ve gıda görevlileri Şekil 1.1'de gösterildiği gibi sorumlulukları ile ilgili testleri yapması gerekmektedir (Honkanen ve Reybroeck, 2000).

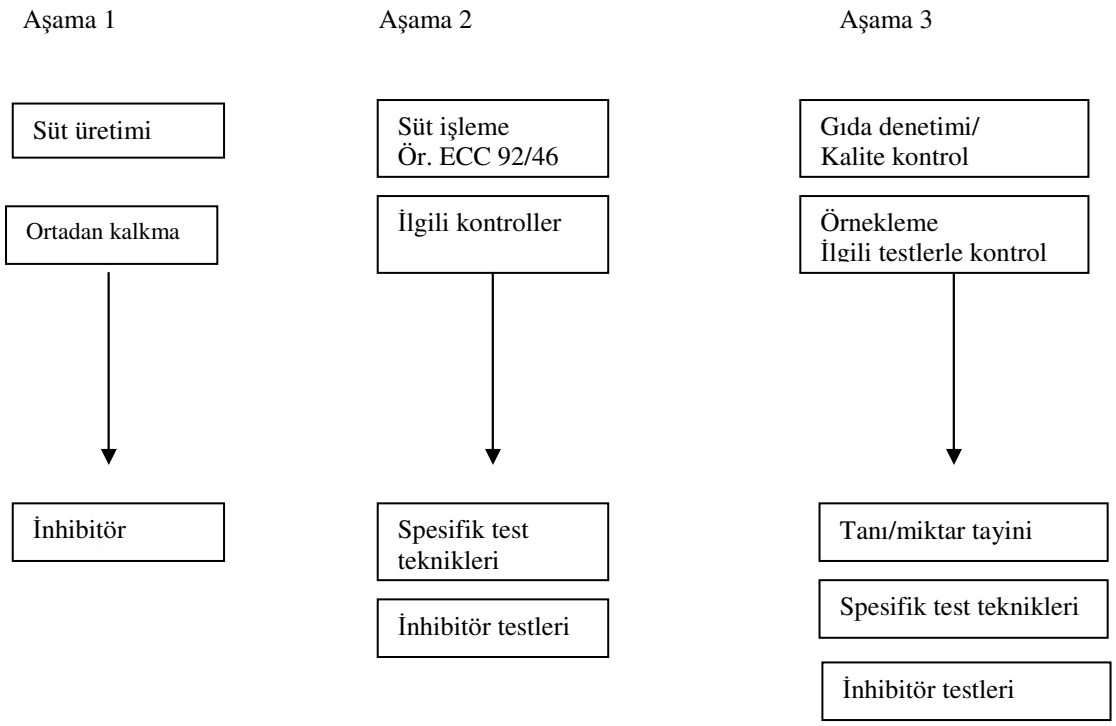
Şekil 1.1. Sütte inhibitör, antibiyotik kalıntılarının bulaşmalarının önlenmesinde yararlanılan entegre bir sistemde sorumlulukların paylaşımı (Honkanen ve Reybroeck, 2000).



MRL belirlenmesi için farklı yöntemler kombine edilerek kullanılabilmektedir. Mikrobiyel inhibitör testleri; çiftlik, süt toplama merkezleri ve kısmen de proses parametrelerinin izlenmesi açısından çok faydalı olduğu belirtilmektedir. Mikrobiyel testler yardımı ile belirlenemeyen antibiyotikler için ilave bir takım testler yapılması zorunluluğu bildirilmektedir. Gıda denetçilerinin de belli örnekleme desenleri ile kendi kalıntı programlarını uygulamak zorunda olduğu belirtilmektedir. Ayrıca gıda denetçileri işletmelerinin kendi kontrol mekanizmalarını da denetlemeleri gerekmektedir. Mikrobiyel testler yanında toksikolojik olarak önemli maddeler için kalıntı kontrollerinin yapılması gerektiği bildirilmiştir. Şekil 1.2'de pratik koşullarda entegre sistemlerinin uygulama prensipleri gösterilmiştir. Entegre sistemin amacı süt

ve süt ürünlerinin teknolojik ve toksikolojik güvenliğini sağlamaktır (Honkanen ve Reybroeck, 2000).

Şekil 1.2. Entegre bir sistemde, sütte antibiyotik kontrolü (Honkanen ve Reybroeck, 2000).



Amerikan süt endüstrisi kalite kontrolünü sağlamayı ve kalıntılarından kaçınmayı başarmıştır. 1990'lardan önce ABD Ulusal Mastitis Konseyi mastitisin önüne geçmek için 5 aşamalı bir plan başlatmış ve kaliteyi arttıran üreticilere ikramiye sunmuştur. Sonuç olarak süt üreticileri kalıntıları en aza düşürmek için 3 madde üstünde durmaktadırlar; sürünün sağlığı, ilaç kullanımının kontrolü ve kalıntı testleridir (Slenning ve ark., 1997).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Ankara'da satışa sunulan 27 firmaya ait seri numaraları ve üretim tarihleri farklı orijinal ambalajında (250 mL, 500mL,1000 mL) alınan 100 pastörize süt ve 100 UHT süt materyal olarak kullanılmıştır.

2.1 Gereçler

Ankara Üniversitesi Bilimsel Teknik Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAUM) laboratuvarlarında mevcut olan HPLC cihazı kullanılmıştır.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) cihazı tip ve özellikleri: Schimadzu marka, Schimadzu LC 10 AD pompa, Schimadzu CTO 1 A kolon fırını, SIL-10 AXL otoinjektör (50µL loop), Schimadzu SPD 10 AVP dedektör, kolon C 18 Phenomenex Luna (250x 4.6 mm 5µm)

Millipore, Milli Q plus; Su arıtma sistemi(18.2MΩ) su üretme kapasitesinde

Charm Rosa MRL Beta-laktam test kitleri

Charm Rosa MRL Tetrasiklin test kitleri

Charm Rosa İnkubatör

Ultrasonic LC 60 H marka ultrasonik karıştırıcı

Spe C 18 Kartuj Alltech marka

Şırınga Tipi Filtre 0.45µm sartorius marka

2.1.1 Antibiyotik Standartları

Tetrasiklin hidroklorür ACROS 500 mg

Klortetrasiklin hidroklorür ACROS 500 mg

Oksitetrasiklin hidroklorür ACROS 500 mg

Penicilin G potasyum tuzu SIGMA(1595 U/mg)

2.1.2 Stok Çözeltiler

Standart antibiyotik	Çözücü	Saklama koşulları
Klortetrasiklin	HCl	-4 ^{0}C
Tetrasiklin	HCl	-4 ^{0}C
Oksitetrasiklin	HCl	-4 ^{0}C
Penisilin G	Metanol	-4 ^{0}C

2.1.3 Çalışma Çözeltileri

Okzalat tampon çözeltisi: 3,94 g Potasyum okzalat , 2.61g Okzalik asit ve 1.22g 1-Dekane sülfonik asit sodyum tuzu %98, distile suda çözdürülerek 1 litreye tamamlandı ve pH 2.3 olacak şekilde ayarlandı.

Fosfat tampon çözeltisi (0,01 M): 1.361 g Potasyum dihidrojen fosfat suda çözdürülerek 1 litreye tamamlandı ve pH 4.7 olacak şekilde ayarlandı.

2.1.4 Çözücüler ve Diğer Kimyasallar

Acetonitrile Gradient Grade HPLC
Hydrochloric Acid 36-38%
Dichloromethane
Methanol HPLC Gradient Grade
n-Hexane 95% HPLC
Phosphoric acid 85%
Oxalic acid dihydrate
Potassium dihydrogen phosphate
Potassium oxalate monohydrate
Sodium chloride
Ethanol Absolute
1-Heptanesulfonic acid sodium salt HPLC
1-Decane Sulfonic acid sodium salt 98%
18-Crown-6 99%

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Charm Rosa Sistem® Test Kitleri İle Sütlerde Kalıntı Aranması

Sütte antibiyotik kalıntısını saptamak amacıyla Charm Sciences Inc®. firmasına ait FDA ve AOAC(Association Official Analytical Communities) onaylı Charm MRL Beta laktam ve Charm MRL Tetrasiklin test kitleri kullanıldı.

Prensip: Rosa Sistem antijen ve antikor ilişkisine göre çalışan antibiyotik belirleme sistemine dayalı bir yöntemdir. Charm Rosa Sistem® kağıtları yüzey üzerine emdirilmiş renklendirilmiş antikor içermektedir.

Buna göre 300 µL süt örneği hazır test kiti üzerinde bulunan hazneye otomatik pipet yardımı ile konuldu. Hazırlanan test kiti Rosa inkübatör cihazında 8 dakika süreyle inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin bitiminde kit üzerinde oluşan T-çizgisinin rengi, C-çizgisi(Kontrol çizgisi)'nin renginden daha açık veya hiç oluşmamışsa pozitif olarak değerlendirildi. T-çizgisinin rengi C-çizgisinden daha koyu veya aynı renkte ise negatif olarak değerlendirildi (Şekil 2.1). Test sonucu elde edilen pozitif olarak değerlendirilen süt örneklerinde kantitatif tayin için HPLC yöntemi uygulandı.

Şekil.2.1 Beta laktam ve tetrasiklin kitleriyle bakılmış pozitif ve negatif numuneler





2.2.2 HPLC Yöntemi İle Tetrasiklinlerin Analizi

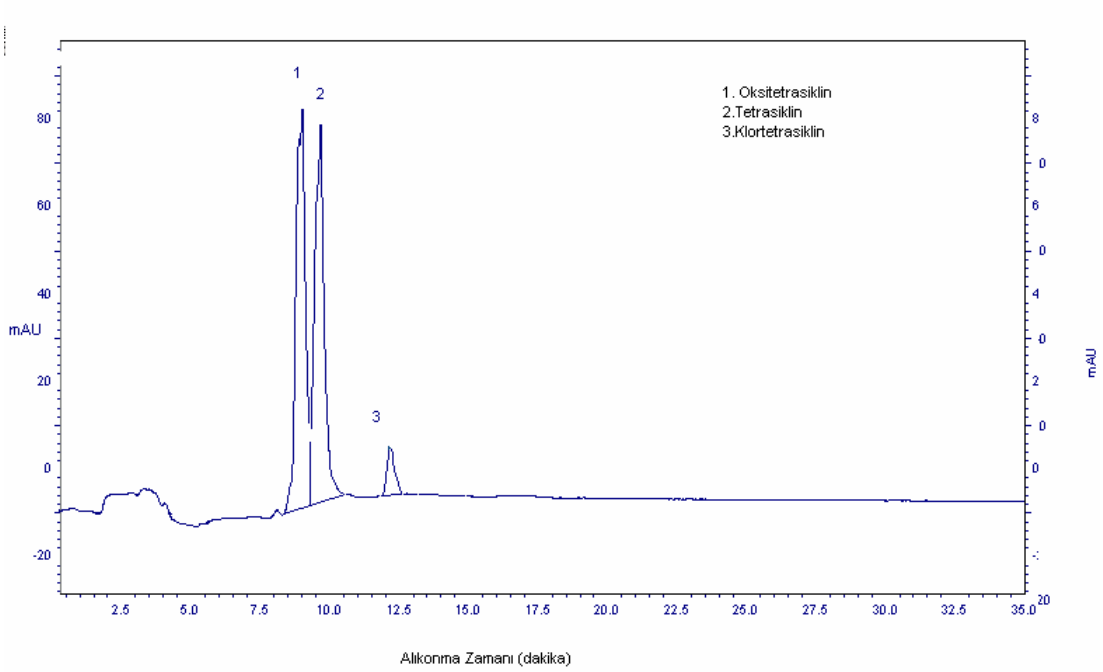
TETRASİKLİNLERİN SÜT NUMUNELERİNDEN ÖZÜTLENMESİ: Oksitetrasiklin, klortetrasiklin ve tetrasiklin saptanması için 5 mL numune süt alınarak behere konuldu, üzerine 1 mL 1N HCl ilave edildi ve sonra karıştırıcıya alınarak üzerine yavaş yavaş 24 mL Asetonitril ilave edilerek 30 saniye beklendi. Filtrat kısmından 15 mL kadar alınarak ayırma hunisine aktarıldı üzerine 15 mL Diklorometh an ve 30 mL n-Hexane konulduktan sonra 15 dakika boyunca sürekli karıştırıldı. Bu süre sonunda ayırma hunisi beklemeye alındı ve bu bekleme sonunda en alt kısımda biriken filtrat kısmı ayrı bir kaba aktarılarak bir enjektör yardımı ile 0.45 μm çaplı filtreden geçirilerek süzüldü. Elde edilen süzüntüden 20 μL alınarak HPLC yöntemiyle analiz edildi (White ve ark. 1993).

Kromotografik şartlar:

Kolon sıcaklığı:42^0C
Kolon akış hızı:1mL/dk
Mobil faz: Asetonitril+ Okzalik asit tamponu (20/80)
Dalga boyu aralığı: 220nm-400nm
Dedektör tipi: Photo diode array (PDA)
Analiz Süresi: 35dk
Gradient program uygulanmıştır.
0-1dk Asetonitril(%20) Okzalik asit tamponu(%80) 1.5 mL/dk
1-3 dk Asetonitril(%20) Okzalik asit tamponu(%80) 1.5 mL/dk
3-10 dk Asetonitril(%38) Okzalik asit tamponu(%62) 1.5 mL/dk
15.dk Asetonitril(%38) Okzalik asit tamponu(%62) 1.5 mL/dk
35.dk Asetonitril(%38) Okzalik asit tamponu(%62) 1.5 mL/dk

362 nm, 376 nm, 355 nm' dalga boylarında kromatogramlar değerlendirildi, kantitasyon 355 nm'de yapıldı. Alıkonma zamanları Çizelge 2.1'de olduğu gibi saptanmıştır.

Şekil 2.2. Oksitetrasiklin, tetrasiklin ve klortetrasikline standartlarına ait kromatogram

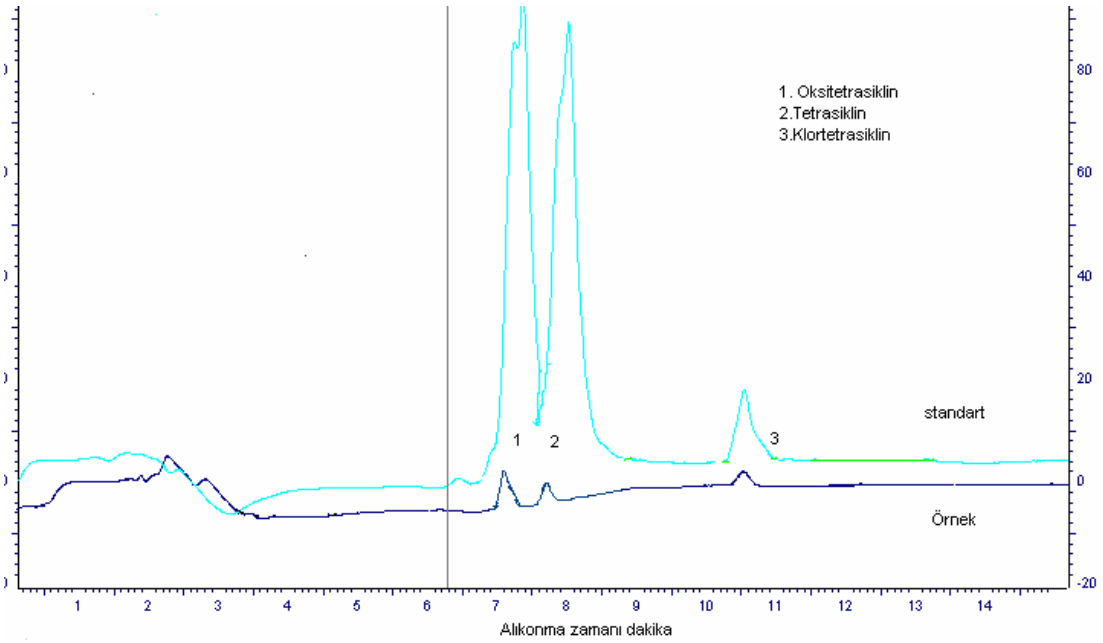


Çizelge 2.1. Oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin'in alıkonma zamanları

Antibiyotik	**Alıkonma zamanı (dk)**
Oksitetrasiklin	9dk 23s
Tetrasiklin	9dk 55sn
Klortetrasiklin	12 dk 19sn

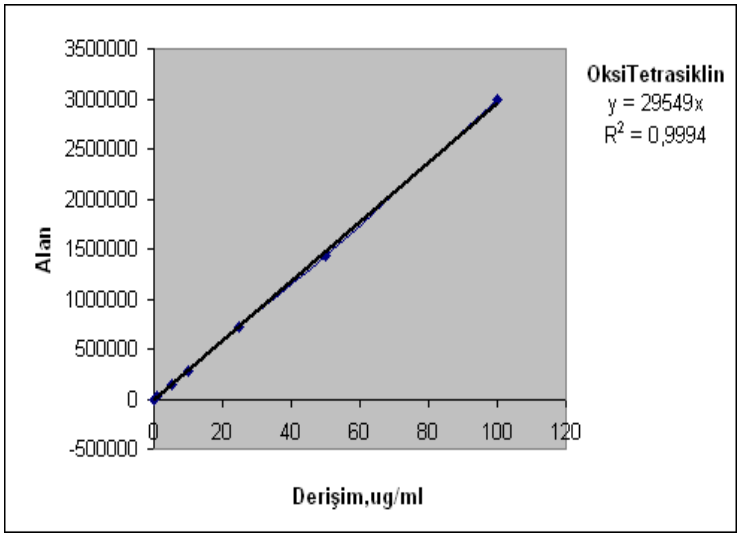
Standart kromatogram ve analizi yapılan bir numuneye ait kromatogram Şekil 2.3'te görülmektedir.

Şekil 2.3. Oksitetrasiklin, Klortetrasiklin, Tetrasikline ve örneğe ait kromatogram



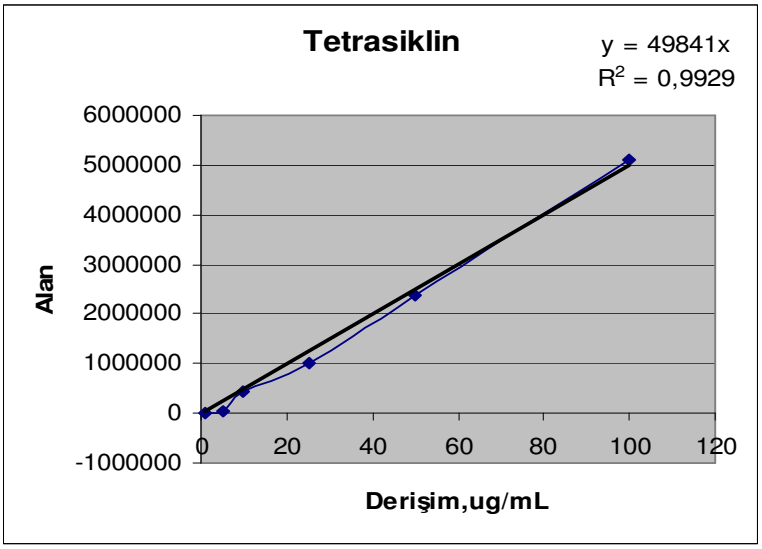
HPLC yöntemi ile Oksitetrasiklin, tetrasiklin ve klortetrasiklin kalıntılarının aranmasında standartların çeşitli derişimler de hazırlanarak elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 2.4, 2.5 ve 2.6'da verilmiştir.

Şekil 2.4: Oksitetrasiklinin kalibrasyon grafiği



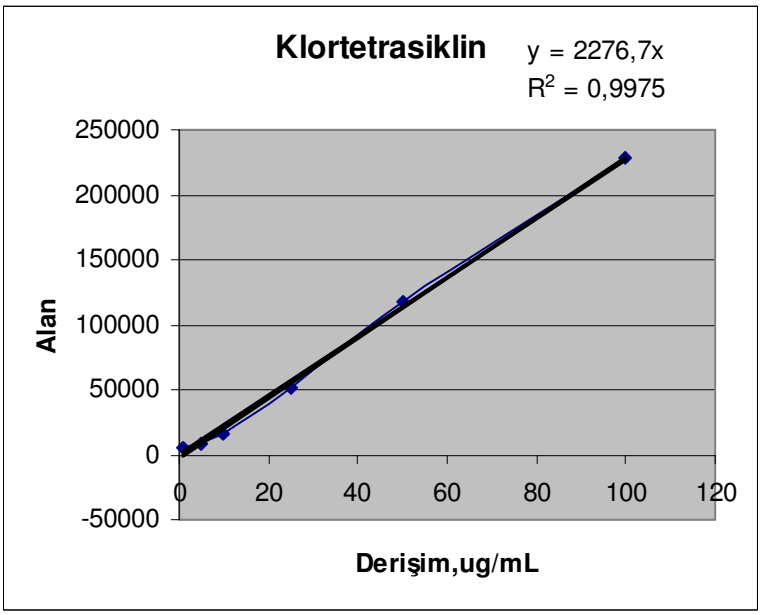
1 ppb
5 ppb
10 ppb
25 ppb
50 ppb
100 ppb
Oksitetrasiklin

Şekil 2.5: Tetrasiklinin kalibrasyon grafiği



1 ppb
5 ppb
10 ppb
25 ppb
50 ppb
100 ppb
Tetrasiklin

Şekil 2.6. Klortetrasiklinin kalibrasyon grafiği



1 ppb
5 ppb
10 ppb
25 ppb
50 ppb
100 ppb
Klortetrasiklin

Recovery test: Bu metotda süt örneklerine miktarını bildiğimiz oranlarda 100 ppb, 10 ppb süte ilave ettik bu işlemi her bir miktar için 5 kere tekrarladık ve geri kazanç oranlarının ortalamasını çizelgedeki gibi elde ettik. Saptama sınırını 5 ppb olarak belirledik.

Çizelge 2.2. Oksitetrasiklin, tetrasiklin ve klortetrasiklin ait geri kazanım oranları

İlave edilen oran(ppb)	**Oksitetrasiklin(%)**	**Tetrasiklin(%)**	**Klortetrasiklin(%)**
100	97.33	96.35	90.08
10	95.58	91.22	85.74
1	90.10	91.64	96.21

2.2.3 HPLC Yöntemi İle β-Laktam (Penisilin)'nin Analizi

Seppak C 18 kartuşun Şartlandırılması: Seppak C 18 kartuşa 5 mL lik bir enjektör adapte edildikten sonra sırasıyla 10 mL metanol, 10 mL su ve 10 mL %2'lik sodyum klorür solüsyonu 2 mL/dk hızla geçecek şekilde yıkanarak şartlandırıldı.

Numunenin özütlenmesi ve türevlendirilmesi: Antibiyotik kalıntısı bulunduğu saptanan süt örneğinin özütlenmesi amacıyla 10 mL süt örneği cam pamuktan süzdürüldü ve 2 mL/dk hızla geçecek şekilde daha önce şartlandırdığımız kartuşa aktarıldı. Daha sonra kartuş 5 mL su ve 0.6 g 18-krown–6 eter içeren 10 mL (metanol-su-%20'lik sodyum klorür (1:8:1)) çözeltisi ile yıkandı. Kartuşa yeni bir enjektör takılarak 5 mL % 15'lik metanol solüsyonu ile işlem tekrarlandı ve erlende toplanan son süzüntünün 20 µL'si alınarak HPLC yöntemiyle analiz edildi (Terade ve Sakabe, 1985).

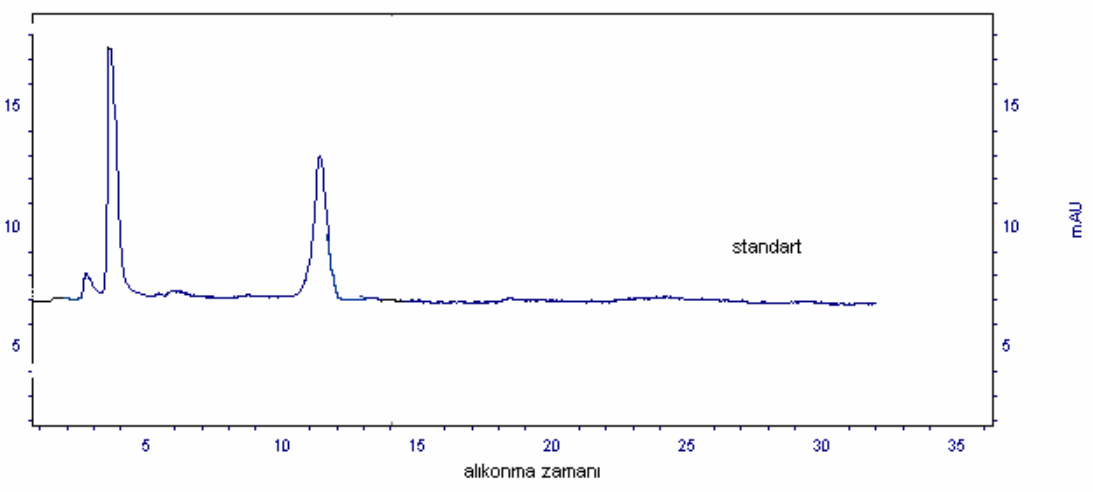
Kromotografik koşullar:

Kolon akış hızı:1mL/dk
Mobil faz: Fosfat tampon çözeltisi
Tarama aralığı dalga boyu:200nm-350nm
Dedektör tipi: Photo diode array(PDA)
Analiz Süresi: 35dk

220 nm, 254 nm, 280 nm' dalga boylarında kromatogramlar değerlendirilmiştir. Kantitasyon 254 nm'de yapılmıştır. Alıkonma zamanı Çizelge 2.2'deki gibi saptanmıştır.

Elde edilen penisilin'e ait standart kromatogram Şekil 2.7, penisilin kalıntısı saptanan örneğe ait bir kromatogram Şekil 2.8'de verilmiştir.

Şekil 2.7 Penisilin'e ait standart kromatogram

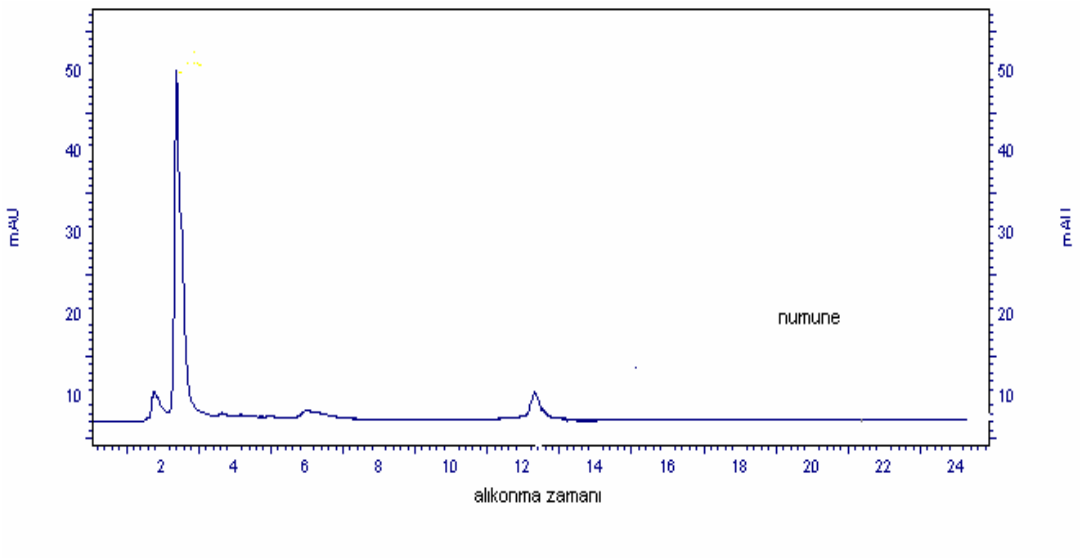


Çizelge2.3 Penisilin alıkonma zamanı

Penisilin	12dk 35sn

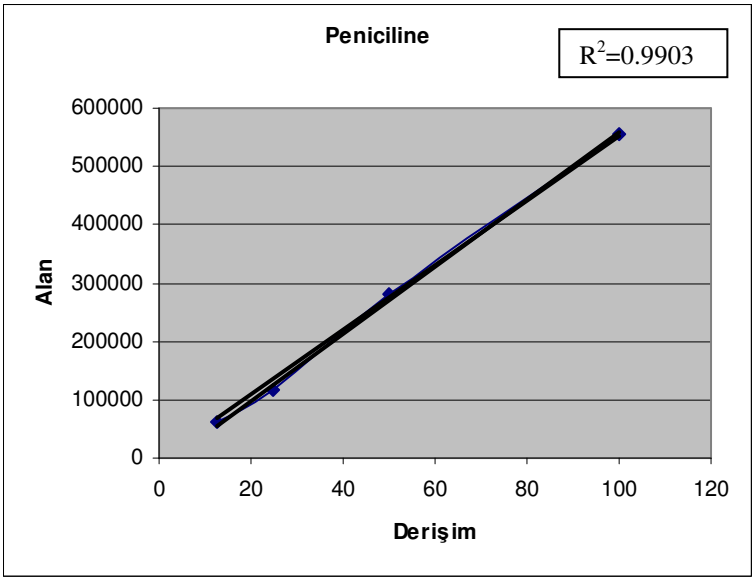
Aşağıdaki şekilde numunede tespit edilen Penisilin G kalıntısına ait bir kromatogram görülmektedir.

Şekil2.8.Penislin kalıntısı tespit edilen bir örneğe ait kromatogram



HPLC yöntemi ile penisilin kalıntılarının aranmasında standartların çeşitli derişimlerde hazırlanarak kullanılmasıyla elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 2.9'da verilmiştir.

Şekil 2.9: Penisilinin kalibrasyon grafiği.



Recovery test: Bu metotda süt örneklerine miktarını bildiğimiz oranlarda 0.1 ppb, 0.5 ppb, 1 ppb süte ilave ettik bu işlemi her bir miktar için 5 kere tekrarladık ve geri kazanç oranlarının ortalamasını çizelgedeki gibi elde ettik. Saptama sınırını 0.03 ppb olarak belirledik.

Çizelge 2.4. Penisilin G geri alma yüzdesi

İlave edilen oran(ppb)	Penisilin G geri alma(%)
0.1	95.6
0.5	96.5
1	93.3

3. BULGULAR

Ankara piyasasında satışa sunulan seri numaraları ve üretim tarihleri farklı 100 pastörize süt ile 100 UHT sütün Charm Rosa test kitleri ile analizi yapılmıştır. Bu çalışma sonucuna 26 pastörize süt ve 10 UHT süt örneği pozitif sonuç vermiştir. Charm Rosa test kitleri ile analizi yapılan ve pozitif sonuç veren 10 UHT süt ve 26 pastörize süt örneğine ait sonuçlar Çizelge 3.1 ve 3.2'de gösterilmiştir. Pozitif olarak değerlendirilen bu örnekler miktar ve antibiyotik çeşidinin belirlenmesi amacıyla HPLC yöntemiyle analiz edilmişlerdir. Araştırmaya pozitif olarak değerlendirilen 36 adet süt örneği ile devam edilmiştir. Charm Rosa test kiti ile antibiyotik varlığı saptanan 10 UHT örneğine uygulanan HPLC yöntemi analiz sonucu Çizelge 3.3'de, antibiyotik saptanan 26 pastörize süt örneğinin HPLC analiz sonucu Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge3.1 Charm Rosa test® kiti ile pozitif sonuç veren UHT süt örnekleri

Örnek no	Firma adı	β-laktam	Tetrasiklin
2	A	-	+
5	B	+	-
17	C	+	-
56	D	+	+
58	E	+	-
88	A	+	+
96	F	+	-
102	G	+	-
128	H	+	-
129	I	+	-

Çizelge3.2 Charm Rosa test® kiti ile pozitif sonuç veren pastörize süt örnekleri

Örnek no	Firma	β-laktam	Tetrasiklin
49	U	-	+
103	K	+	+
132	K	+	-
154	L	+	+
156	M	+	+
158	N	+	+
161	M	+	+
167	O	+	-
171	O	-	+
172	K	+	+
173	U	+	-
174	P	+	+
175	K	+	-
176	U	+	+
177	N	+	-
179	U	-	+
180	P	-	+
182	N	-	+
183	U	-	+
184	K	+	+
185	O	+	-
186	O	+	+
187	K	+	-
188	M	+	+
189	U	+	-
191	P	+	-

3.1 HPLC yöntemiyle pastörize sütlerde saptanan antibiyotik kalıntıları ve çeşitleri

Charm Rosa test kitleri ile pozitif sonuç veren 26 pastörize süt örneğine uygulanan HPLC yöntemi ile saptanan antibiyotik kalıntı düzeyleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Charm Rosa test kiti ile pozitif sonuç veren 26 Pastörize süt örneğinin HPLC yöntemiyle elde edilen kalıntı düzeyleri

Örnek no	Firma	Oksitetrasiklin (ppb)	Tetrasiklin (ppb)	Klortetrasiklin (ppb)	Penisilin (ppb)
49	J	**150,79**	17,58	9,27	0≤0.03
103	K	**143,79**	0≤5	0≤5	**21,23**
132	K	0≤5	0≤5	0≤5	**13,18**
154	L	**201,51**	50,43	0≤5	**25,05**
156	M	**144,27**	44,72	0≤5	**32,17**
158	N	**136,47**	60,68	0≤5	**11,91**
161	M	**174,86**	59,84	0≤5	**19,07**
167	O	0≤5	0≤5	0≤5	**4,82**
171	O	**166,09**	75,77	0≤5	0≤0.03
172	K	**136,69**	69,87	0≤5	**32,36**
173	J	0≤5	0≤5	0≤5	**8,57**
174	P	**318,51**	60,61	0≤5	**4,38**
175	K	0≤5	0≤5	0≤5	**33,86**
176	J	**113,77**	15,56	0≤5	**20,47**
177	N	0≤5	0≤5	0≤5	**22,99**
179	J	**111,3**	66,15	0≤5	0≤0.03
180	P	**142,03**	**116,26**	0≤5	0≤0.03
182	N	70,87	**225,40**	0≤5	0≤0.03
183	J	**130,31**	57,12	0≤5	0≤0.03
184	K	**113,98**	56,12	0≤5	**4,40**
185	O	0≤5	0≤5	0≤5	**5,17**
186	O	90,16	**124,70**	8,39	**4,21**
187	K	0≤5	0≤5	0≤5	**5,43**
188	M	74,17	**144,42**	8,42	**4,28**
189	J	0≤5	0≤5	0≤5	**4,35**
191	P	0≤5	0≤5	0≤5	**6,67**

HPLC yöntemi kullanılarak incelenen 26 pastörize süt örneğinin bazılarında bir, pozitif örneklerin bazılarında birden fazla antibiyotik kalıntısı saptanmıştır. Buna göre, bu kalıntıların 9'unda yalnızca penisilin kalıntısı, 4'ünde yalnız oksitetrasiklin kalıntısı, 1'inde yalnız tetrasiklin kalıntısı saptanmış örneklerin 1'inde hem oksitetrasiklin hem de tetrasiklin kalıntısı, 9'unda hem oksitetrasiklin hem de penisilin kalıntısı, 2'sinde hem tetrasiklin hem de penisilin kalıntısı saptanmıştır. Örneklerde penisilin kalıntısı en düşük 4.28 ppb, en yüksek 33.86 ppb, oksitetrasiklin kalıntısı en düşük 111.3 ppb, en yüksek 318.51 ppb, tetrasiklin kalıntısı en düşük 116.26 ppb, en yüksek 225.40 ppb düzeyinde görülürken hiçbir örnekte MRL seviyeleri üzerinde klortetrasiklin kalıntısı saptanamamıştır.

3.2 HPLC yöntemiyle UHT sütlerde saptanan antibiyotik kalıntıları ve çeşitleri

Charm Rosa test® kitleri ile pozitif sonuç veren 10 UHT süt örneğine uygulanan HPLC yöntemi ile saptanan antibiyotik kalıntı düzeyleri Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 Charm Rosa test kiti ile pozitif sonuç veren 10 UHT süt örneğinin HPLC yöntemiyle elde edilen kalıntı düzeyleri

Örnek no	Firma adı	Oksitetrasiklin (ppb)	Tetrasiklin (ppb)	Klortetrasiklin (ppb)	Penisilin (ppb)
2	A	**430,97**	62	0≤5	0≤5
5	B	0≤5	0≤5	0≤5	**36,21**
17	C	0≤5	0≤5	0≤5	**6,91**
56	D	**135,89**	0≤5	0≤5	**26,74**
58	E	0≤5	0≤5	0≤5	**11,88**
88	A	**134,94**	0≤5	0≤5	**15,85**
96	F	0≤5	0≤5	0≤5	**32,63**
102	G	0≤5	0≤5	0≤5	**26,20**
128	H	0≤5	0≤5	0≤5	**14,80**
129	I	0≤5	0≤5	0≤5	**6,37**

HPLC yöntemi kullanılarak incelenen 10 UHT süt örneğinin bazılarında bir, bazılarında birden fazla antibiyotik kalıntısı saptanmıştır. Bu kalıntıların 7'sinde yalnızca penisilin kalıntısı, MRL seviyesi üzerinde yalnız 1'inde oksitetrasiklin kalıntısı saptanırken birden fazla antibiyotik kalıntısı içeren yalnız 2 örnekte hem oksitetrasiklin hem de penisilin kalıntısı saptanmıştır. Fakat örneklerin hiç birinde MRL seviyeleri üzerinde tetrasiklin ve klortetrasiklin kalıntısı saptanamamıştır.

Çizelge3.5 Firmalara göre MRL seviyeleri üzerinde kalıntı saptanan örnek miktarları

Firma	**Pastörize**				**UHT**			
	Penisilin G	Tetrasiklin	Klortetrasiklin	Oksitetrasiklin	Penisilin G	Tetrasiklin	Klortetrasiklin	Oksitetrasiklin
A	-	-	-	-	1	-	-	2
B	-	-	-	-	1	-	-	-
C	-	-	-	-	1	-	-	-
D	-	-	-	-	1	-	-	1
E	-	-	-	-	1	-	-	-
F	-	-	-	-	1	-	-	-
G	-	-	-	-	1	-	-	-
H	-	-	-	-	1	-	-	-
I	-	-	-	-	1	-	-	-
J	3	-	-	3	-	-	-	-
K	6	-	-	4	-	-	-	-
L	1	-	-	1	-	-	-	-
M	3	1	-	2	-	-	-	-
N	2	1	-	1	-	-	-	-
O	3	1	-	1	-	-	-	-
P	2	1	-	2	-	-	-	-

İncelenen toplam 36 süt örneğinde saptanan antibiyotik kalıntı bulgu sonuçları Çizelge 3.6'te toplu olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Elde edilen verilerin oransal sonuçları

Antibiyotik	**Pastörize süt(%)**	**UHT süt(%)**	**Toplam(%)**
Oksitetrasiklin	4 (%4)	1 (%1)	**5 (% 2.5)**
Tetrasiklin	1 (%1)	0	**1 (% 0.5)**
Klortetrasiklin	0	0	**0**
Penisilin	9 (%9)	7 (%7)	**16 (% 8)**
Oksitetrasiklin+Tetrasiklin	1 (%1)	0	**1 (% 0.5)**
Oksitetrasiklin+Penisilin	9 (%9)	2 (%2)	**11 (% 5.5)**
Tetrasiklin+Penisilin	2 (%2)	0	**2 (% 1)**
Oksitetrasiklin+Tetrasiklin+Penisilin	0 (%0)	0	**0 (% 0)**
Toplam	**26 (%26)**	**10 (%10)**	**36 (%18)**

4.TARTIŞMA

Ankara piyasasında satılan pastörize ve UHT sütlerde bazı antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi amacı ile yapılan bu çalışmada Charm Rosa Sciences® test kitleri ile 10 UHT süt örneğinde ve 26 pastörize süt örneğinde olmak üzere toplam 36 örnekte β-laktamlardan penisilin ve tetrasiklinlerden tetrasiklin ve oksitetrasiklin antibiyotik kalıntı varlığı saptanmıştır. Örneklerdeki antibiyotiklerin çeşitlerini ve miktarlarını belirlemek amacıyla 36 süt örneğine uygulanan HPLC yöntemi sonucu bazı örneklerde bir, bazı örneklerde birden fazla antibiyotik kalıntısına rastlanılmıştır. Buna göre 4'ü (% 2) pastörize süt ve 1'i UHT süt olmak üzere toplam 5 örnekte (% 2.5) sadece Oksitetrasiklin'e, pastörize süt örneklerinin sadece 1'inde tetrasikline, 9'u pastörize süt 7'si UHT süt olmak üzere toplam 16 örnekte (% 8) sadece penisilin, 1 pastörize süt örneğinde (% 0.5) hem oksitetrasiklin hem de tetrasikline, 9'u pastörize süt 2'si UHT süt olmak üzere toplam 11 örnekte (% 5.5) hem oksitetrasiklin hem de penisilin, 2 pastörize süt örneğinde (% 1) hem tetrasiklin hem de penisilin kalıntısı saptanmıştır. Maksimum kalıntı seviyeleri üzerinde hiçbir örnekte klortetrasiklin kalıntısı tespit edilememiştir. Antibiyotik kalıntı kirliliği olarak değerlendirildiğinde 10'u UHT sütte (% 10) ve 26'sı pastörize sütte (% 26) olmak üzere toplam 36 örnekte (% 18) maksimum kalıntı seviyeleri üzerinde antibiyotik kalıntısı bulunmuştur (Çizelge3.6).

Charm Rosa Sciences® test kitleri ile penisilin, tetrasiklin, ampisilin, cefquinome, cefazolin, cloxacillin, dicloxacillin kalıntıları farklı test kitleri ile saptanabilmekte, HPLC yöntemi ile de kantitatif olarak ölçümü yapılabilmekte olup bunun haricinde kalan kloramfenikol, sulfonamid, streptomisin vb. antibiyotik kalıntılarının saptanamaması dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca sütte inhibitör etki gösteren antiparaziter olarak sıklıkla kullanılan aynı zamanda antibiyotik özelliği olan ivermectin'in uygulama sonrası sütte uzun süre (28-35gün) kalıntı oluşturması (Akgün, 2004; WHO, 1993) yüzünden fermentasyona olan negatif etkisi ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Dolayısıyla sütteki kalıntılarının araştırılması,

yöntemlerin geliştirilmesi ve tüm antibiyotik kalıntılarının saptanabilmesi için çalışmalara önem verilmesi gerekmektedir.

İncelenen 200 süt örneğinden 36'sında antibiyotik kalıntısının saptanması, firmaların süt alım aşamasında otokontrol yapmadıklarını, kısaca sorumsuzluğu ve/veya Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın denetimlerinin yetersiz olduğunu ve ilgili firmaların, antibiyotik kalıntılı süt ile yoğurt, peynir. vb. ürün yapamayacaklarından, bilinçli olarak pastörize ve/veya UHT süt olarak satıp kazanç elde etmeyi amaçladıklarını ortaya koymaktadır.

Çeşitli ülkelerde süt ve süt ürünlerinin antibiyotik ilaç kalıntılarıyla bulaşma sıklığı, aynı ülkede yetiştiricilerin konuya ilişkin eğitim düzeylerine, yasal düzenlemelere ve denetim etkinliklerine göre önemli derecede değişebilmektedir. (Allison 1985). Nitekim Dünya Sağlık Örgütü(WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), uzmanlar komisyonunca (JECFA) süt hijyenine yönelik olarak hazırlanan teknik rapor sonuçlarına göre ABD, Avustralya, İngiltere ve İskoçya gibi gelişmiş ülkelerde 1962 yılına kadar üretilen süt ve süt ürünlerinin antibiyotik ilaç kalıntılarıyla kirlenme sıklığı % 13 oranlarında iken, belirtilen tarihten itibaren gerekli önlemlerin alınmasından sonra üretilen aynı ürünlerin kirlenme sıklığı ABD'de 1990'da % 0.12, 1996'da % 0.14, 2003'de % 0.067, İtalya'da 2003'de % 0.034, İngiltere'de 2000 yılında % 0.03, İsveç'te 1998 ile 2003 yılları arasında % 0.26 ile % 0.08, İrlanda'da 2003 yılında % 1 ve Kanada'da 2001 ile 2002 yıllarında % 0 olduğu rapor edilmiştir. Aynı rapor kapsamında hayvan yetiştiricilerinin bilinçlendirilmesi, hijyenik koşulların düzeltilmesi ve denetim etkinlikleri yönünden yetersiz kalan az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde süt ürünlerinde karşılaşılan kirlenme oranının; Brezilya'da 2000 ile 2001 yıllarında % 4.3 ile % 50, Hindistan'da 1995'de % 9, Polonya'da % 13 ile % 22, Portekiz'de 1981 ile 1985 yılları arasında % 10 ile % 64, gibi oldukça yüksek düzeyde oldukları bildirilmektedir (Ghidini, 2003; Moats ve Romanowski, 1998; Anon, 2004; Leon, 1992; Barbosa ve ark. 1990; Anon 2005b; Anon 2005c; Shitandi, 2002).

Türkiye'de sütlerde antibiyotik madde kalıntılarının belirlenmesine yönelik olarak yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. En kapsamlı olanı Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı koordinatörlüğünde Türkiye'nin çeşitli illerinde bulunan 5 Veteriner

Kontrol ve Araştırma Enstitüsü ve 9 İl Kontrol Laboratuvarı tarafından yürütülen gıdalarda veteriner ilaç kalıntı düzeylerinin tespitine yönelik çalışmadır. Bu araştırmada 3084 süt örneği penisilin, tetrasiklin ve kloramfenikol kalıntıları yönünden intertest yöntemiyle analiz edilmiş ve 377'sinin (% 12) pozitif olduğu belirlenmiştir (Anon, 2005a). Bu % 12'lik kirlenme oranının, pastörize sütlerdeki antibiyotik saptama oranımızdan daha düşük (% 26, Çizelge 3.6), UHT sütlerdeki bulgularımızdan daha yüksek olduğu (% 10) görülmüştür. Farklılık o dönemde antibiyotik kullanma sıklığının günümüzden daha az olmasına rağmen antibiyotik tedavisi görmüş ineklerden sağılan sütlerin sağlam sütlere karıştırıldığının ve/veya antibiyotiğin vücuttan atılma sürelerine uyulmadığının kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığınca kalıntı izleme planı çerçevesinde yapılan analizlerde, 2000 yılında süt örneklerinin % 24'ünün β-laktam ve % 8'inin sülfadimidin kalıntısı içerdiği bildirilmiştir (Anon, 2005a). Tarım ve Köy İşleri Bakanlığınca 2003 yılında kalıntı izleme ilanı çerçevesinde 2003 yılında analiz edilen 194 süt örneğinin 21 'inde (% 10.85), yine Tarım ve Köy İşleri Bakanlığınca 2004 yılında Kalıntı İzleme Planı çerçevesinde analiz edilen 185 süt örneğinde % 14'ü β-laktam pozitif bulunmuştur (Anon, 2005a). Türkiye genelinde sütlerdeki penisilin kalıntı oranının 2000 yılında % 24 iken, 2004 yılında % 14 oranına düşmesi, çalışmaların ve denetimlerin artması, önlemlerin uygulamaya konulması sonucu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca modern süt fabrikalarının sayılarının artması, süt toplama merkezlerinin çoğalması ve bu merkezlerde süt alım esnasında antibiyotik varlığını saptama testlerinin uygulanmaya başlanmış olmasının düşüşte etkili olduğu düşünülmektedir. Buna rağmen, çalışmamızda Ankara'da tüketime sunulan pastörize ve UHT sütlerde hala %14.5 oranında (Çizelge 3.6) ve 4.28 ppb ile 33.86 ppb arasında değişen düzeyde penisilin bulunması, yetiştiricilerin bilincinin artmadığına süt fabrikalarının kendi denetimlerini etkin yapmadıklarına ve Tarım ve Köy işleri Bakanlığı'nın denetimlerinin esaslı ve periyodik olarak yürütülmediğine işaret etmektedir.

Aydın ve ark (1989), toplam 204 çiğ süt örneğinde intertest yöntemiyle % 44, agar difüzyon yöntemiyle ise % 15.7 oranında inhibitör madde saptamışlardır. Buna

karşın araştırmamızda elde edilen verilere göre (Çizelge 3.6) pastörize süt örneklerinde kalıntı oranı %26, UHT süt örneklerinde % 10, toplam süt örneği sayısına göre % 18 olduğu, sonuçların Aydın ve ark (1989) intertest yöntemiyle elde ettiği oranlardan düşük olduğu, agar difüzyon yöntemiyle elde ettikleri sonuçlara yakın olduğu görülmüştür. Bu durumun farklı materyalin ve yöntemlerin sonuçlar arasındaki farklılığından ve/veya antibiyotiğin sütten atılma süresinin farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir.

Ceyhan ve Bozkurt (1987), Ankara piyasasında satılan 100 çiğ süt, 50 pastörize süt, 50 UHT süt örneği olmak üzere toplam 200 süt örneği üzerinde yaptıkları çalışmada, örnekleri penisilin yönünden % 5.5 oranında pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırma verilerinin, bulgularımızdan (Çizelge3.6) daha düşük olması yöntem farklılığından, kullanılan yöntemin HPLC'ye göre daha az hasssas olmasından, antibiyotiğin sütten atılma süresinin farklılığından ve/veya imha edilmesi gereken antibiyotikli sütün karıştırıldığı sağlam süt miktarının daha fazla olmasından diğer bir deyimle dilüsyon farklılığından kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir.

Pastörize ve UHT sütlerde oksitetrasiklin, klortetrasiklin, tetrasiklin ve penisilin kalıntılarının araştırıldığı bu çalışmada penisilin kalıntısı oranı pastörize sütlerde % 20, UHT sütlerde % 9 oranında toplam örnek sayısına göre % 14.5 olarak bulunmuştur. Demet ve ark. (1992)'nın Konya'da faaliyet gösteren çeşitli mandıra ve süt işletmelerinden getirilen 50 adet çiğ süt örneğinde HPLC yöntemi ile penisilin G, ampisilin ve penisilin V kalıntılarını araştırdıkları çalışmada, süt örneklerinin 6'sında (%12) penisilin G-potasyum saptandığını, penisilin V ve ampisilin ise bulamadıklarını bildirmişlerdir. Elde edilen sonucun çalışmamızda elde edilen sonuçlara yakın olduğu görülmüştür.

Önal ve ark (1993) Ankara'da 444 çiğ süt örneğini intertest ve agar difüzyon test yöntemiyle incelemiş ve 39'unun (% 8.78) penislin yönünden, 24'ünü (% 5.4) tetrasiklin yönünden pozitif olduğunu bulmuşlardır. Dokuzlu ve Tayar (2001), ise

Bursa ve çevresindeki çiğ sütlerde antibiyotik varlığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 150 sütü intertest ve agar difüzyon yöntemiyle incelemişler ve 27 örneği (% 18) penisilin yönünden ve 11 örneği (% 7.33) tetrasiklin yönünden pozitif bulmuşlardır. Çalışmamızda toplam 200 süt örneğinin %14.5'inde penisilin % 4'ünde tetrasiklin kalıntısı belirlenmiş olup bu sonuçların Dokuzlu ve Tayar (2001)'ın belirttiği düzeylerden daha düşük olduğu görülmüştür.

Türkiye'de pastörize ve UHT sütlerde antibiyotik kalıntılarının kantitatif olarak saptanmasına yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Temiz ve Öner (1988) Ankara'da birisi kamu diğeri özel iki süt işletmesine gelen çiğ sütleri kalıntı yönünden incelemişler ve kamuya gelen 182 süt örneğinin 11'inde (% 6) değişik düzeylerde penisilin varlığını saptamışlardır. Araştırmada; 0.01 IU/mL düzeyinde penisilin içeren örnek sayısının 8 (% 4.39), 0.01–0.05 IU/mL düzeyleri arasında penisilin içeren örnek sayısının 3 (% 1.65) olduğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada özel işletmeye gelen 153 süt örneğinin 22'sinde (% 14.3) penisilin varlığına rastlamışlardır. Bunlardan 11 örnekteki kalıntı miktarının 0.01 IU/mL'den çok, 8 örnekte 0.01IU/mL'ye eşit, 1'örnekte ise 0.01-0.05 IU/mL arasında, 1'inin 0.05 IU/mL'den büyük değerde penisilin içerdiğini bulmuşlardır. Antibiyotik kalıntısı saptanan çiğ sütlerin imha edilmediği vurgulanmayan bir gerçektir. Araştırmamızda elde edilen verilere göre (Çizelge 3.6 ve 3.4) UHT sütlerde penisilin kalıntısı oranı % 9 olmakla birlikte penisilin miktarı 6.37 ppb-36.21 ppb düzeyinde, pastörize sütlerde penisilin kalıntısı oranı % 20, penisilin miktarı 4.21 ppb- 33.86 ppb düzeyinde belirlenmiştir. Temiz ve Öner (1988)'in buldukları değerler 6 ppb-30 ppb arasında değişmekte ve hassasiyetlerinin 6 ppb olduğu görülmektedir. Kullanılan yöntemin farklı hassasiyette olması ve çalışmada farklı materyal kullanılmış olması çalışmamızda elde edilen sonuçlar arasındaki farklılığın nedenini açıklamaktadır.

Pastörize sütlerde penisilin kalıntısı aranmasına ve düzeylerinin belirlenmesine yönelik Temiz ve Çelik (1990) Ankara piyasasından temin edilen 77 pastörize süt örneğini TTC ile analiz etmişler ve 5 örnekte (% 6.48) 0.05 IU/ml civarında penisilin veya eşdeğer etkiye sahip antibiyotik bulunduğunu saptamışlardır. Benzer bir çalışmada İleri ve Karaboz (1993) İzmir piyasasından toplanan 350

pastörize süt örneğinde penisilin varlığını incelemişler ve sonuçta 22 süt örneğinin (% 6.28) antibiyotik içerdiğini, miktarın ise ortalama olarak 0.06 IU/ml düzeyinde olduğunu bulmuşlardır. Her iki çalışmada da kalıntı düzeylerinin birinde 30 ppb ile diğerinde 36 ppb düzeyleri arasında gerçekleştiği görülmüştür. Araştırmamızda elde edilen verilere göre (Çizelge 3.1, 3.3) pastörize sütlerde antibiyotik kalıntısı %20 ve penisilin miktarının 4.21 ppb ile 33.86 ppb düzeyinde değiştiği, penisilin varlığının kalıntı saptama oranının yüksek olmasına karşın, kalıntı düzeylerinin düşük olduğu anlaşılmıştır. Bu farklılığın kullanılan metodun hassasiyetinden ve/veya antibiyotiğin sütten atılma süresinin farklılığından kaynaklanmış olabileceği seklinde düşünülmüştür.

5.SONUÇ

Ankara piyasasında satışa sunulan çeşitli firmalara ait seri numaraları ve üretim tarihleri farklı 100 pastörize süt ve 100 UHT süt örneğinde oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin ve penisilin kalıntıları kalitatif olarak Charm Rosa System® test kitleriyle saptanmış ve pastörize süt örneklerinin % 26'sında, UHT süt örneklerinin % 10'unda, toplam 36 süt örneğinde antibiyotik varlığı belirlenmiştir. Antibiyotik varlığı saptanan örneklerin HPLC yöntemiyle analizi sonucu, klortetrasiklin dışında düzeylerinin MRL seviyelerini aştığı gözlenmiştir. MRL seviyeleri üzerinde tetrasiklin kalıntısı saptanan örneklerde en düşük 116.26 ppb, en yüksek 225.40 ppb, MRL seviyeleri üzerinde oksitetrasiklin kalıntısı tespit edilen örneklerde, en düşük 111.37 ppb, en yüksek 430.97 ppb, MRL seviyeleri üzerinde penisilin G kalıntısı tespit edilen örneklerde, en düşük 4.21 ppb, en yüksek 36.21 ppb düzeyinde olduğu bulunmuştur. Örneklerde saptanan klortetrasiklin kalıntı düzeylerinin MRL seviyesine ulaşmadığı da belirlenmiştir. Bulgular hayvan yetiştiricilerinin tam bilinçlenmediğinin, hijyenik koşulların düzeltilmediğinin, fabrikalarda süt alım aşamasında yapılan otokontrollerin ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının denetimlerinin yetersiz olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla antibiyotiklerin sadece veteriner hekim reçetesiyle satılması ve tavsiyesi ile kullanılması zorunlu hale getirilmelidir. Her bir veteriner bazlı antibiyotiklerin vücuttan atılma süreleri beklenmeli ve yetiştiricilerin bu konu hakkında bilinçlendirilmesi ve ciddi resmi denetim ve izleme programlarının uygulanması gerekmektedir.

Çalışmada içme sütlerinde belirlenen antibiyotiklerin kalitatif ve kantitatif oranlarının Türkiye'de yapılan diğer araştırma sonuçlarına göre daha yüksek bulunduğu, antibiyotiklerin yasal bekleme sürelerine uyulmadığı ve bulunan değerlerin, Türk Gıda Kodeksi (2005) Yönetmeliğindeki "Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği"nde bildirilen değerlerin üstünde olması nedeniyle, hem yasal yönden, hem de halk sağlığı açısından risk oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Pastörize ve UHT Sütlerde Antibiyotik Kalıntılarının HPLC Yöntemi İle Belirlenmesi

Ankara piyasasında satışa sunulan çeşitli firmalara ait seri numaraları ve üretim tarihleri farklı 100 pastörize süt ve 100 UHT süt örneğinde oksitetrasiklin, tatrsiklin, klortetrasiklin ve penisilin kalıntıları kalitatif olarak Charm Rosa System test kitleriyle saptanmış ve pastörize süt örneklerinin % 26'sında, UHT süt örneklerinin % 10'unda, toplam 36 süt örneğinde antibiyotik varlığı belirlenmiştir. Antibiyotik varlığı saptanan örneklerin HPLC yöntemiyle analizi sonucu, klortetrasiklin dışında düzeylerinin MRL seviyelerini aştığı gözlenmiştir. MRL seviyelri üzerinde tetrasiklin saptanan örneklerde en düşük 116.26 ppb, en yüksek 225.40 ppb, MRL seviyeleri üzerinde oksitetrasiklin tespit edilen örneklerde, en düşük 111.37 ppb en yüksek 430.97 ppb, MRL seviyeleri üzerinde penisilin G tespit edilen örneklerde, en düşük 4.21 ppb en yüksek 36.21 ppb düzeyinde olduğu gözlenmiştir. Örneklerde saptanan klortetrasiklin düzeylerinin MRL seviyesine ulaşmadığı da belirlenmiştir.

Bulunan değerlerin Türk Gıda Kodeks'inde (2005) Yönetmeliğindeki "Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği"nde bildirilen değerlerin üzerinde olduğu anlaşılmıştır. Çalışmada sütlerde antibiyotik kalıntı varlığının Türkiye'de yapılan diğer çalışmalara göre daha yüksek olduğu, ilaçların yasal bekleme sürelerine uyulmadığı, yetiştiricilerin tam olarak bilinçlenmediği, fabrikaların süt alım aşamasında kendi denetimlerini yapmadıkları ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının denetimlerinin yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelime; Süt, antibiyotik, kalıntı, HPLC, Charm Rosa System

SUMMARY

Determination of antibiotic residues in pasteurized and UHT milk by HPLC method

Total of 100 pasteurized and 100 UHT milk samples with different serial numbers and production dates which belong to various companies at Ankara market were examined, in milk samples oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and penicillin residues were analyzed with the Charm Rosa System®. In 26 % of pasteurized milk samples and 10 % of UHT milk samples, totally 36 sample, different antibiotic samples were determined with HPLC method. It was found that the MRL levels were in exceed of the normal levels except with the chlortetracycline. It has been observed that minimum level was 116.26 ppb and the maximum level was 225.40 ppb in the ones with tetracycline, 111.37 ppb and 430.97 ppb in the ones with oxytetracycline, 4.21 ppb and 36.21 ppb in the ones with penicillin.

It was determined that the values that have been found in the study were over the value that was declared in the Turkish Food Codex (2005) at "Maximum Residue Limits of Veterinary Medicinal Products In Foodstuffs Of Animal Origin" In this study the antibiotic residues in milk samples are higher than the other studies which were carried out in Turkey. Consequently it is concluded that the legal waiting period of the medicines are in discordance, the stock farmers are not skilled enough, the factories are not carried out their routine controls during the stage of trade and the traceability of the Ministry of Agriculture is unsufficient.

Key Words: Milk, Antibiotic, residue, HPLC, Charm Rosa System.

KAYNAKLAR

AK, S. (2000): Trakya yöresinde sığır mastitisinden sorumlu bulaşıcı ve çevresel bakteriyel etkenler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *İ.Ü Vet. Fak. Derg* 26(**2**): 353-365

AKAN, M., KÖKÇÜ, L., ÖNCEL, T., EKEN, S.(2001): Mastitislerden izole edilen stafilokok suşlarının β-laktamaz aktivitesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları.*Vet. Hek. Mikrob. Derg*. 1(**2**):31-34

AKGÜN, S.(2004): Süt ve ürünlerinde bulunan antibiyotiklerin insan sağlığına ve üretime verdiği zararlar. *Ders Notları*

ANDERSON, K.L., MOATS, W.A., RUSHING, J.E., WESEN, D.P., PAPICH, M.G., (1995): Potential of oxytetracycline administration by three routes to cause milk residues in lactating cows, as detected by radioimmunoassay (Charm II) and HPLC test metods. *Am J Vet Res*. 56:70-77

ANDREW, S.M., (2000): Effect of fat protein content of milk from individual cows on the specifity rates of antibiotic residue screnning tests. *J Dairy sci* 83: 2992-2997

ANON, (1987): Le lait maiere premiere de l'industrie laitiere.Cepil, 145, rue de L'Universite 75007, Paris

ANON, (1988): Evaluation of certain veterinary drug residues in food.32nd report of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical Report Series. 763, WHO Geneva

ANON, (1992): ECC DIRECTIVE 92/675, Annex OF COUNCIL Regulation no. 2377/90 **Layind down community procedure for the establishment of maximum residue litimts of veterinary medical products in food stuffs of animal origin. OJ no. L 73. 19.03.1992, sf 8-14**

ANON, (2002):Drug-Resistant Salmonella serotypes found :www.anapsid.org/salmilk.html

ANON, (2004): Dairy Food Safety. 2004 National Dairy Council http/: www.nationaldairycouncil.org

ANON, (2005): Canlı Hayvanlar ve hayvansal ürünlerde belirli maddeler ile bunların kalıntılarının izlenmesi için alınacak önlemlere dair yönetmelik. 19.01.2005 tarih ve 25705 sayılı Resmi Gazete.

ANON, (2005a): Tarım ve Köy İşleri bakanlığının Ulusal Kalıntı İzleme Planı Sonuçları; 2000, 2001, 2002, 2003, 2004 yılı kalıntı izleme planı sonuçları. Tarım Ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Ankara.

ANON, (2005b): Canadian food inspection agency-food safety directorate-report on pesticides in: www.inspection.gc.ca.

ANON, (2005c): Dept of Agriculture&food http/: www.agriculture.gov.ie.

ARAYA M., DAVIDOVICH G., ARIAS M.L., CHAVES C.(2005): Identification of *Enterococcus spp.* isolated from raw milk samples coming from the metropolitan area of Costa Rica and evaluation of its antibiotic sensibility pattern *Arch Latinoam Nutr*.55(2):161-166.

ASLİM, B., BEYATLI, Y., (2004): Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yoghurts. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*. 28:257-263

AYDIN, N., CANBAZOĞLU, M., AYHAN, H. (1989): İntertest yöntemi ile sütteki antibiyotiklerin ve diğer inhibitör maddelerin saptanması üzerine çalışmalar. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg*.6(**5**):11-22

BARBOSA, M., CALHAU, I., CORREIA, M.(1990): Detection of antibiotic residues in consumption milk(1981-1985) Brisf commumications of the XXIII International Dairy Congress, October8-12, Montreal Vol 1:114

BAYDAN, E., KAYA, S., YARSAN, E.,(1997): Hayvansal dokulardaki veteriner ilaç kalıntıları üzerine pişirme, dondurma ve benzeri İşlemlerin Etkileri. Uluslararası tavukçuluk fuarı ve konferansı YUTAV 1997 İstanbul

CANZEK MAJHENIC A., ROGELJ I., PERKO B.(2005): Enterococci from Tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *Int J Food Microbiol*.102(2):239-244.

CARMAN, R.J., SIMON, M.A., PETZOLD III, H.E., WIMMER, R.F., BATRA, M.R., FERNANDEZ, A.H., MILLER, M.A., BARTHOLOMEW, M.,(2005): Antibiotics in human food chain: Establishing no effect levels of tetracycline, neomycin and erytromycin using a chemostat model of the human colonic microflora. *Regul Toxıcol Pharm* 43: 168-180

CEYHAN, I., BOZKURT.,(1986): Ankara piyasasında satılan sütlerde penisilin araştırması. *Türk Hij Dern Biyol Derg*. 44:1-5

CHAGONDA, L.S., NDIKUWERA, J.,(1989): Antibiotic residues in milk supplies in Zimbabwe. *J Food Protect* 52(**10**);731-736

CHİNGWARU W., MPUCHANE S.F., GASHE B.A.(2003): Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance. *J Food Protect* 2003 66(**6**):931-936.

CINGUINA A.L., LONGO F., ANASTASI G., GIANNETTI L., COZZANI, R.,(2003): Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr* A 987; 227-233

CLAYCAMP, H.G., HOOBERMAN, B.H.(2004): Antimicrobial Resistance Risk assesment in Food Safety. *J Food Protect*. 67(**9**):2063-2071.

ÇETİN, Ö., ERGÜN, Ö (2000): Hayvansal kökenli gıda maddelerinde penisilin kalıntıları ve getirdiği riskler. *İ.Ü. Veteriner Fak. Dergisi* 26(**2**), 427-431

DELGADO S., DELGADO T., MAYO B.,(2002): Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *J Food Protect* 65(**10**):1590-1596

DEMET,Ö.,ACET, A., TRAŞ, B., BAŞ, L.,EĞİLMEZ, İ.,(1992): Konya'da faaliyet gösteren çeşitli mandıralardan toplanan süt örneklerinde penisilin G, ampisilin ve penisilin V kalıntılarının araştırılması. *S.Ü. Vet Fak Derg* 8:33-35

DEMİRCİ, M.,(2000): Süt mikrobiyolojisi ve katkı maddeleri. VI. Süt ve Süt ürünleri Sempozyumu Tebliğler kitabı. sf 254-265

DEWDNEY, J.M., MAES, L., RAYNAUD, J.P, BLANC, F., SCHEID, J.P., JACKSON, T., LENS, S., VERSCHUEREN, C.,(1991): Risk assesment of antibiotic residues of β-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chem Toxıcol* 29(7):477-483

DI CORCIA A., NAZZARI, M.,(2002): Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotics and antibacterial agents in animal food products. *J Chromatogr A* 974:53-89

DISERENS, J. M., RICHARD, M., BECK, A.,(1995): Recovery of penicillin and sulfamethazine from contaminated milk after spray drying. symposium on residue of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. *IDF*: 149-150

DİZDAR,E., GÜNAL, S., DEVELİ, N., YILMAZ, F., GÖKTÜRK, S., ATAYETER, Y., (1994): Hayvansal ürünlerde antibiyotik ve antibiyotik benzeri madde kalıntılarının araştırılması. İl kontrol laboratuvar müdürlüğü Genel yayın:006, Özel yayın:019 Ankara.

DOKUZLU, C., TAYAR, M.(2001): Bursa ve çevresinde çiğ sütlerde antibiyotik varlığının belirlenmesi. *Vet. Bil. Derg*. 17(**1**): 153-157

DONTOROU C., PAPADOPOULOU C., FILIOUSSİS G., ECONOMOU V., APOSTOLOU I., ZAKKAS G., SALAMOURA A., KANSOUZİDOU A., LEVİDİOTOU S.(2003): Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *Int. J. Food Microbiol.* 82(**3**):273-279.

DUBOIS, M., FLUCHARD, D., SIOR, E., DELAHAUT, P., (2001): Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 753:189-202

EGAN,J., O'CONNOR, F (1990): A note on the persistance of antibiotic residue on milking equipment folowing the passage of antibiotics treated milk *Irısh J Agric Res* 29:155-159

EMEA(2000): Commitee for Veterinary Medicinal Products. Penicillins. Summary. Report.

ERGÜN, Ö., HOROZ, H.,(1992): Sütte antibiyotik kalıntıları ve bunların teşhis metotları. *Gıda* 17(3): 203-206

EROL, İ. (2004): Türk Veteriner Hekimleri Birliğinin 50. Kuruluş yılı. 4. Dünya Veteriner Hekimleri Günü Panel: Cumhuriyetin 100. Yılında Veteriner Hekimlik 24 Nisan 2004 Gıda Güvenliği ve Halk Sağlığı. Türkiye Diyanet Vakfı Kon.Salonu Kocatepe .Ankara

FAO/WHO(1996):Residues of some veterinary drugs in animals and foods.41/9

FAO/WHO(1996a):Residues of some veterinary drugs in animals and foods.41/6

FINEGOLD, M.N., MATHİSEN, G. E., GEORGE, W.L.,(1983): Changes in human intestinal flora related to the administration of antimicrobial agents.in: CARMAN, R.J., SIMON, M.A., PETZOLD III, H.E., WIMMER, R.F., BATRA, M.R., FERNANDEZ, A.H., MILLER, M.A., BARTHOLOMEW, M.,(2005): Antibiotics in human food chain: Establishing no effect levels of tetracycline, neomycin and erytromycin using a chemostat model of the human colonic microflora. *Regul Toxıcol Pharm* 43: 168-180

FURUSAWA, N., (1999): Rapid liquid chromatographic determination of oxytetracycline in milk. *J Chromatogr A* 839:247-251

GHIDINI, S., ZANARDI, E., VARISCO, G., CHIZZOLINI, R., (2003):Residues of β-lactam antibiotics in bovine milk: confirmatory analysis by liq. Chrom. tandem mass spectrometry after microbial assay screning. *Food Addit and Contam*.20(**6**):528-534

GROLLMAN, A., GROLLMAN, E.F.(1970): Antibiotics. Pharmacology and therapeutics. Lea&Feiber . Philedelphia 7.edition pg:581-606

GÜLEY, Z., AKBULUT, N.,(2000): Antimikrobiyal Maddeler ve Süt Teknolojisindeki önemi. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı.254-265

GÜRLER, N.(2003): Hastanede sorun olan mikroorganizmalar: Gram pozitif koklar. 3.Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi, 2-4 Ekim,2003 Samsun

GÜNDOĞAN, N., CİTAK, S.(2005): Slime production, Dnase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. *Food control xxx:xxx-xxx*

HAALAND, M.A., MANSPEAKER, J.E., MORELAND,T.W.(1985): Antibiotikarüsckstande inder milch nach intrauterin infusion. *Milchwissenschaft* 40(7):439 İn: ERGÜN, Ö., HOROZ, H.,(1992): Sütte antibiyotik kalıntıları ve bunların teşhis metotları. *Gıda derg* 17(3): 203-206

HADİMLİ, H.H., ATEŞ, M., GÜLER, L., KAV, K., ÖNCEL, T.,(2001): Mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilokokların β-laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet. Bil. Derg*.17(**4**): 21-25

HAVERBECK,J.,MULLAN, W.A.M., WALKER, A.L, (1987): Sensitivity of intertset, oxoid test, delvotest P and disc assay antibiotics. *J Soc Dairy Techol* 36(**2**):36-40

HEESCHEN, H .,BLUTHGEN, A, (1991): Veterinary Drugs and pharmacological

activite compounds in: Residue and Contaminants in milk Products published by *IDF* ;16-33 Belgium

HERREROS, M.A., SANDOVAL, H., GONZALEZ, L., CASTRO, J.M., FRESNO, J.M.,TORNADIJO, M.E.,(2005): Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese . *Food Microbiol* 22: 455-459

HONKANEN- BUZALSKI, T., REYBROECK, W.,(2000): Antimicrobials, monograph on residue and contaminants in milk and milk products, *IDF Special İssue* 9701

HUBER, W.G.(1974): Penicilin. Tetracyclines. Veterinary Pharmacology and Therapeutics Iowa State University Pres. Iowa.U.S.A Ed. Jones L.M sf:503-537

HUYS, G., D'HAENE, K., COLLARD, J.M., SWINGS, J.,(2004): Prevelance and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(**3**):1555-1562

IMERMAN, P.M.,TAYLOR, J.A.,TIMMS, L., (1996): Direct online HPLC method for analyzing beta lactam residues in milk. 1996 *Dairy Report-Iowa State University*.

İLERİ, N., KARABOZ, İ., (1993): İzmir'de pazarlanan pastörize sütlerde mikrobiyolojik yolla penisilin kalıntılarının aranması. *Kükem dergisi* 16(**2**);58-59

JACKSON.,(1999): The effect of processing on veterinary residues in foods. Impact of processing on food safety edited by Jackson. *Kluwer academic. Plenum publisher*, New York.

JEVINOVA, P., DUDRIKOVA, E., SOKOL, J.,NAGY, J., MATE, D., PIPOVA, M., CABADAJ, R., (2003): Determination of oxytetracycline residues in milk with the use of HPLC method and two microbial inhibition assays. *B Vet I Pulawy* 47;211-216

KANNY G, PUYGRENIER J, BEAUDOIN E, MONERET-VAUTRİN DA.(1994), Alimentary anaphylactic shock:implication of penicilin residues. *Allerg Immunol* 26(**5**):181-183

KAYA, S.,ÜNSAL, A.,(2000): Besinlerdeki ilaç kalıntıları ve denetimi. sf713-730 Veteriner uygulamalı farmakoloji Cilt 2. Baskı 2. Ed. Kaya, S., Pirinçci, İ., Bilgili, A. Medisan yayınevi.Ankara.

KAYA, S.,YAVUZ, H., AKAR, F.,LİMAN, B.C., FİLAZİ, A., (1992): Mezbahadan sığır et, karaciğer ve böbrek örneklerinden antibiyotik kalıntıları. *A.Ü Vet Fak Derg*. 39 (1-2): 13-29

KENNEDY, D.G., MCCRAKEN, R. J., CANNAVAN, A. AND HEWITT, S. A., (1998): Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analyses of residues of antibiotics in meat and milk. *J Chromatogr A*, 812: 77-98

KINIK, Ö., AKBULUT, N., KARAGÖZLÜ, C., (2002): Süt ve süt ürünlerinde kalıntı ve kontaminantlar. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları*. 551:31-42

LEON, D.(1992): Antibiotic residues in milk and meat: Perceptions and Realities. 1222-1228

LIM, K. S., HUH, C. S., BAER, Y. J.,(1995): Studies on the antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria in cultured products. *Dairy Science Abstracts* 7982

LINDEMAYR H, KNOBLER R, KRAFT D, BAUMGARTNER W.(1981): Challenge of penicillin-allergic volunteers with penicillin-contaminated meat. *Allergy*. 36(*7)*:471-478.

MATHUR S, SİNGH R.(2005): Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *Int. J. Food Microbiol*.105(**3**):281-295.

MAYRA-MAKINEN, A.(1995): Technological, significance of residues for the dairy ın;Residues of antimicrobial drugs and other inhibitor in milk published by yhe *I.D.F.* ;137-138 Belgium

MITCHEL, J., GRİFFİTS, M.W., MCEVEN, S.., MCNAB, W. B., YEE,, A:J., (1988): Antimicrobial drug residues in milk and meat; causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance, *J Food Protect*, 61(**6**): 742-756

MOATS, W.A., ROMANOWSKI, R.D.,(1998): Multi residue of β-lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *J Chromatogr A* 812; 237-247

MURİNDA SE, EBNER PD, NGUYEN LT, MATHEW AG, OLIVER SP.(2005): Antimicrobial resistance and class 1 integrons in pathogenic *Escherichia coli* from dairy farms. *Food Borne Pathog Dis*.(**4**):348-352.

OKA, H., ITO, Y., IKAI, Y., KAGAMI, T., HARADA, K., (1998): Mass spectrometric analysis of tetracycline in foods. *J Chromatogr A*, 812:309-319

OMBUI, J.N., KIMOTHO, A.M., NDUHIU, J.G.,(2000): Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* isolates from milk and meat. *E Afr. Med. J*. 77(**9**): 463-470

ORMEROD A.D., REİD T.M., MAIN R.A.(1987): Penicilin in milk-İts importance in urticaria. *Clin Allergy.* 17(**3**):229-34.

ÖNAL, A.,AYDIN, N., AYAZ, Y., İŞCAN, D., SAVAŞ, N.,(1993): Süt ve etlerde bulunan Bazı antibiyotiklerin çeşitli yöntemlerle saptanması. *Etlik Vet Mikrobiyol Enst Derg* 7:34-51

ÖZER, E., HOROZ, H.,(1992): Sütte antibiyotik Kalıntıları ve bunların Teşhis metotları *Gıda dergisi* 17(3)**: 203-206**

PAIGE, J.C.,TOLLEFSON, L., MILLER, M., (1997): Public health impact on drug residues in animal tissues. *Vet Hum Toxicol* 39: 162-169

PENA, A. L., LİNO, C.M., SILVERIA, I. N.,(1999): Determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in milk by liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *J of AOAC İnt* 82;55

PERRETEN, V., TEUBER, M. (1995): Resistant bacteria in fermented dairy products a new challenge for raw milk cheeses, symposium on residue of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. *IDF*: 144-148

PICOZZI C, FOSCHİNO R, HEUVELINK A, BEUMER R.(2005), Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region .*Lett Appl Microbiol*.40(**6**):491-496.

PODHORNIAK, L.V., LEAKE, S., SCHENCK, F. J., (1999): Stability of tetracycline antibiotics in raw milk under laboratory storage conditions. *J Food Protect* 62(**5**):547-548

RAMIREZ,A.,GUTIERREZ, R., DIAZ, G., GONZALES, C., PEREZ, N., VEGA, S., NOA, M., (2003): High performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residue in cow milk. *J chromatogr B*,784:315-322

RIVIERE, J.E., SPOO, J.W.(2001): Tetracycline antibiotics .Veterinary pharmacology and therapeutics Iowa state Pres 8. Edition . Ed. Adams, H.R.sf:829-838

RUDZKI E, ROMANSKI B, DYNOWSKA D, KACZMARSKI M, KURZAWA R, OBTULOWICZ K, BLINOWSKI J, KORZENİOWSKA-ZUK E, OLEDZKA-RZEPECKA E, PIELA Z, ET AL.(1994): Clinical characterization of "asthma-prurigo" syndrome with emphasis on risk factors. *Pneumonol Alergol Pol*. 62(**7-8**):397-404.

SCHENCK, F.J., CALLERY, P.S., (1998): Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J Chromatogr A*, 812:99-109

SCHLEGELOVA J., BABAK V., KLIMOVA E., LUKASOVA J., NAVRATILOVA P., SUSTACKOVA A., SEDIVA I., RYSANEK D.(2002): Prevalence of and resistance to anti- microbial drugs in selected microbial species isolated from bulk milk samples. *J. Vet Med B* 49(5):216-25.

SCHWARZ, S., KEHRENBERG, C., WALSH, T.R.(2001): Use of Antimicrobial agents in Veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimic Ag*, 17: 431-437

SEZEN,İ.Y., ERGANİŞ, O., ÇORLU, M.,ATEŞ, M.,(1986): Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus'*larda penisilin rezistansı ile bazı enzim karakterleri ve biyokimyasal testler üzerinde çalışmalar. *Selçuk Üniv. Vet. Fak. Dergisi* 1(**2**): 91-101

SHAIKH, B., MOATS, W.A. (1993): Liquid chromatographic analysisi of antibacterial drug residues in food products of animal origin. *J Chromotogr*. 643:369-378

SHITANDI, A.,(2002): Risk factors and control strategies forantibiotic residue in milk at farm level in Kenya. *J Food Protect*67(**21**): 399-402

SLENNING, B.D., GARDNER, I.A., (1997): Economic evalution of risk to producers who use milk residue testing programs. *Journal of The American veterinary Medical Association*, 211:419-427

STEAD, D..A.,(2000): Current methodologies for the analyses of aminoglycosides. *J Chromatogr B*, 747: 69-93

ŞANLI, Y., KAYA. S., YAVUZ., AYDIN, N., AKAR. F., DOĞAN, A. (1991): Süt ürünlerin de kloramfenikol kalıntıları *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 38(**3**):402-416

TAKEBA, K., FUJINIMA, K., MIYAZAKI, T., NAKAZAWA, H.,(1998): Simultaneous determination of β-lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. *J Chromatogr A*,812:205-211

TANCRADE, C., BARAKAT, R.,(1987): Ecological impact of low doses of oxytetracycline on human intestinal microflora. *J Vet Med.*:35-39

TANNOCK, G.W.,(1995): Normal microflora. and introduction to microbes inhibating the human body. Chapman& Halli, London p.77-79

TEALE, C.J. (2002): Antimicrobial resistance and food chain. *J.Appl. Microbiol. Symp. Suppl*. 92: 85-89

TEKİNŞEN, C.,(2000): Süt Ürünleri Teknolojisi 3.Baskı *Selçuk Üniversitesi Basımevi Ankara*

TEKİNŞEN, C., ATASEVER, M.(1994): Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi*. sf:71-72

TEMİZ, A., ÖNER, Z., (1988): Ankara'daki iki ayrı süt işletmesine gelen çiğ sütlerde antibiyotik belirlenmesi. *Gıda derg* 13(**4**);289-295

TEMİZ, A., ÇELİK, S., (1990): Ankara'da pazarlanmakta olan pastörize ve UHT sütlerde antibiyotik varlığının belirlenmesi *Gıda dergisi* 15(4)**:205-210**

TEMMERMAN, R., POT, B., HUYS, G., SWINGS, J.,(2002): Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol*. 81: 1-10

TERADA, H., SAKABE, Y.(1985): Studies on residual antibacterials in foods. IV. Simultaneous determination of penicillin G, penicillin V and ampicillin in milk by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 348(**2**):379-387.

TUNCER, İ.(2000): Antibiyotik direnç mekanizmaları. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi.8-13 Ekim 2000 Antalya.

UÇAN,S.U., ASLAN, E.(2002): İnek mastitislerinden izole edilen koagulaz pozitif stafilokok suşlarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet Bil Derg*. 18(**3**):19-22

UMOH, V.J., ADESIYUN A.A., GOMWALK N.E.(1990): Antibiogram of *staphylococcal* strains isolated from milk and milk-products. *Zentralbl Veterinarmed B*. 37(**9**):701-706.

URAZ, G., ÖNCÜL, Ö.,(2003): Pseudomonas, Aeromonas ve Bazı Enterobacteria'larda β-laktamaz enzim aktivitesi. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu(SEYES*) bildiriler kitabı. Editör Prof. Dr. Necati Akbulut sf:483-487

UYSAL, H., KINIK, Ö., GÖNÇ, S.(1995): Yoğurda işlenecek sütün özellikleri ve antibiyotiklerin yoğurt teknolojisine ve kalitesine etkileri. *Fırat Üniv. Ziraat Fak.Yayınları* 26-37

VADEN, S.L., RIVIERE, J.(2001): Penicillins and related β-lactam antibiotics. Veterinary Pharmacology and Therapeutics Iowa state Pres. Iowa 8. Edition U.S.A . Ed. Adams, H.R.pg: 819-826

VAUTIER,H.E., POSTIGO, C.B (1986): Bovine mastitis and antibiotic residues in milk. Risk to public health. *World Animal Review.* October-December.41-42

VOLTANEN, M.V., VOLTANEN, V.V., SALO, O.P.,(1976): The effect of long term tetracycline treatment for acne vulgaris on the occurrence of R factors in the intestinal flora of man. *Br.J. Dermatol.*95:311-316 in; CARMAN, R.J., SIMON, M.A., PETZOLD III, H.E., WIMMER, R.F., BATRA, M.R., FERNANDEZ, A.H., MILLER, M.A., BARTHOLOMEW, M.,(2005): Antibiotics in human food chain: Establishing no effect levels of tetracycline, neomycin and erytromycin using a chemostat model of the human colonic microflora. *Regul Toxıcol Pharm* 43: 168-180

WHITE, C.R., MOATS, W.A., KOTULA, K. L.(1993): Optimization of a liquid chromatographic method for determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortatracycline in milk. *J of AOAC İnt* 76(**3**): 549-554

WHO. (1993): Food Additives series: 49 Toxicological evaluation of certain Veterinary drug residues in food.

WILSON, A., SCHILD, H.O(1952): Penicilin. Clark's Applied Pharmacology.J.& A. Churchill Ltd. 104 Gloucester place W.1. London pg:543-552

YALMAN, A.,(1993): Antibiyotik kullanımı ve antibiyotiklerin istenmeyen etkileri. İstanbul Tıp Fakültesi Antibiyotik Kontrol Komitesi Tarafından Düzenlenmiştir. Logos yayıncılık.

YETİŞMEYEN, A. (1995): Süt teknolojisi, *Ankara Üniv. Ziraat Fak Yayınları* s:123, Ankara