

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE  
TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ALABALIKLARDA (*Oncorhynchus mykiss*) HASAT ÖNCESİ  
VE HASAT DÖNEMİ YENİLEBİLİR DOKU  
ÖRNEKLERİNDE FLOROKİNOLON GRUBU  
ANTİBİYOTİKLERDEN ENROFLOKSASİN  
KALINTILARININ ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

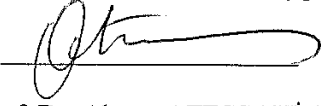
**Bayram KABADAYI**

**2014**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

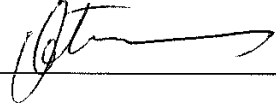


Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

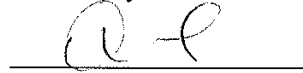
Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN



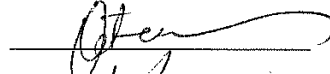
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Gürdal DAĞOĞLU



Prof.Dr.Ahmet ATEŞŞAHİN



Doç.Dr.Fatih SAKİN



## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimim süresince laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimini eksik etmeyen Prof.Dr. Gürdal DAĞOĞLU ve Anabilim dalımız diğer öğretim üyelerine, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör.Dr. Burcu Gül BAYKALIR, Arş.Gör. Mustafa Selim DOĞRU ve İbrahim Ozan TEKELİ'ye, Elazığ veteriner kontrol enstitüsünde birim sorumlum Ayşe Türkan ÇİFTÇİ'ye, mesai arkadaşlarıma ve aileme, ayrıca bu tez çalışmasını VF.12.09 no'lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon (FÜBAP) Birimi'ne teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                 |             |
|-------------------------------------------------|-------------|
| <b>Başlık sayfası</b>                           | <b>i</b>    |
| <b>Onay sayfası</b>                             | <b>ii</b>   |
| <b>Teşekkür</b>                                 | <b>iii</b>  |
| <b>İçindekiler</b>                              | <b>iv</b>   |
| <b>Tablo listesi</b>                            | <b>vi</b>   |
| <b>Şekil listesi</b>                            | <b>vii</b>  |
| <b>Kısaltmalar listesi</b>                      | <b>viii</b> |
| <b>1. Özet</b>                                  | <b>1</b>    |
| <b>2. Abstract</b>                              | <b>3</b>    |
| <b>3. Giriş</b>                                 | <b>4</b>    |
| 3.1. Florokinolonların Kimyasal Yapısı          | 5           |
| 3.2. Florokinolonların Etki Mekanizması         | 6           |
| 3.3. Florokinolonların Etki Spektrumu           | 7           |
| 3.4. Florokinolonların Farmakokinetiği          | 7           |
| 3.5. Florokinolonlarda Farmakodinamik           | 9           |
| 3.6. Enrofloksasin Metabolitleri                | 10          |
| 3.7. Florokinolonlarla Diğer İlaç Etkileşimleri | 11          |

|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| 3.8. Kullanım Şekli ve Dozu                | 12        |
| 3.9. Florokinolonların Kullanıldığı Yerler | 12        |
| 3.10. Florokinolonların Üstünlükleri       | 13        |
| 3.11. Gıdalarda Kalıntı                    | 14        |
| <b>4. Gereç ve Yöntem</b>                  | <b>17</b> |
| 4.1. Gereç                                 | 17        |
| 4.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler        | 17        |
| 4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar         | 17        |
| 4.1.3. Hayvan Materyali                    | 17        |
| 4.2. Yöntem                                | 18        |
| 4.2.1. Standart Hazırlama                  | 18        |
| 4.2.2. Ekstraksiyon İşlemi                 | 18        |
| 4.2.3. HPLC Sistem                         | 19        |
| 4.2.4. İstatistiksel Analizler             | 19        |
| <b>5. Bulgular</b>                         | <b>20</b> |
| <b>6. Tartışma</b>                         | <b>25</b> |
| <b>7. Kaynaklar</b>                        | <b>29</b> |
| <b>8. Özgeçmiş</b>                         | <b>33</b> |

## TABLO LİSTESİ

|                 |                                                                                                                                                          |           |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tablo 1.</b> | Türk Gıda kodeksine göre enrofloksasinin hayvan türlerine ve dokularına göre bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı miktarları.                       | <b>16</b> |
| <b>Tablo 2.</b> | Hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıklarda tespit edilen enrofloksasin miktarları (ng/g).                                                                | <b>21</b> |
| <b>Tablo 3.</b> | Hasat öncesi ve hasat dönemi tüm işletmelerdeki alabalıklarda deri, kas ve karaciğer dokularındaki enrofloksasin miktarlarının karşılaştırılması (ng/g). | <b>22</b> |
| <b>Tablo 4.</b> | Hasat dönemi alabalıklarda maksimum kalıntı limiti (MKL) üzerindeki miktarlar (adet).                                                                    | <b>23</b> |
| <b>Tablo 5.</b> | İşletmelerde tespit edilen ortalama enrofloksasin miktarları ile minimum ve maksimum değerleri ng/g ( $\bar{X} \pm Sd$ ).                                | <b>24</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Enrofloksasinin kimyasal yapısı. **6**
- Şekil 2.** Hasat öncesi ve hasat dönemi tüm işletmelerdeki alabalıklarda deri, kas ve karaciğer dokularındaki ortalama enrofloksasin miktarları (ng/g). **22**

## KISALTMALAR LİSTESİ

|           |                                                 |
|-----------|-------------------------------------------------|
| HPLC      | Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi             |
| MIK       | Minimal inhibitör konsantrasyon                 |
| MBK       | Minimal bakterisidal konsantrasyon              |
| EAA       | Eğri altındaki alan                             |
| $C_{max}$ | Plazma maksimum konsantrasyon değeri            |
| PAE       | Postantibiyotik etki                            |
| MKL       | Maksimum kalıntı limiti                         |
| EMA       | Avrupa tıbbi ürünler değerlendirme ajansı       |
| LC-MS     | Likit kromatografisi - kütle spektrofotometresi |
| $V_d$     | Dağılım hacmi                                   |
| $V_{dss}$ | Kararlı durum dağılım hacmi                     |
| GABA      | Gamma aminobütirik asit                         |
| $Cl_t$    | Klirens                                         |



## 1. ÖZET

Enrofloksasin çeşitli bakteriyel hastalıkların sağaltımında kullanılan florokinolon grubu bir antibiyotiktir. Bu çalışmada, alabalıkların yenilebilir dokularındaki (deri, kas ve karaciğer) enrofloksasin kalıntı miktarları araştırılmıştır. Elazığ ilindeki beş farklı ticari alabalık işletmesinden 25 adet hasat öncesi ve 25 adet hasat dönemi olmak üzere toplam 50 adet alabalık toplanmıştır. Numunelerdeki enrofloksasin düzeylerinin tespiti yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Analizler sonucunda hasat öncesi dönemi alabalıklarının tüm dokularında enrofloksasin 3-10935 ng/g doku düzeylerinde tespit edilmiştir. Hasat dönemindeki alabalıklarda ise 4 işletmede 0-8171 ng/g doku tespit edilmiş, bir işletmede ise tespit edilememiştir. İşletmelerdeki kalıntı miktarlarının ortalamaları karşılaştırıldığında, tüm dokularda hasat öncesi dönem hasat dönemine göre daha yüksek bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Yenilebilir dokular kendi arasında karşılaştırıldığında derinin en fazla kalıntı içerdiği, kas ile karaciğerin ise birbirine yakın düzeylerde olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Hasat dönemi alabalıklarında analiz edilen 25 adet numunenin 17 adedinde deri+kas dokusu doğal oranlarında kalıntı limiti üzerinde enrofloksasin tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, özellikle hasat öncesi dönemlerde olmak üzere tüm işletmelerde farklı zaman dilimlerinde enrofloksasin kullanıldığı ve hasat dönemi alabalıklarında %68 oranında maksimum kalıntı limitlerinin (MKL) üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Enrofloksasin, alabalık, kalıntı, HPLC.

## 2. ABSTRACT

Investigation of the remains of fluoroquinolone antibiotic enrofloxacin during pre-harvest and harvest period in edible tissue samples of trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Enrofloxacin is a fluoroquinolone antibiotic used in treatments of various bacterial diseases. In this study, residue levels of enrofloxacin were investigated in edible tissues (skin, muscle and liver) of trout. During the preharvest period 25 samples and harvest period 25 samples of trout, total of 50 samples were collected in the province of Elazig from five different trout facilities. Levels of enrofloxacin in samples were analyzed by high pressure liquid chromatography (HPLC).

As a result of analyzes, remain of enrofloxacin of preharvest period in all tissues range 3-10935 ng/g tissue were determined. During harvest period of trout, residue levels were determined in four trout facilities range of 0-8171 ng/g tissue but one trout facility was not determined. When compared the means of residue levels in facilities, preharvest period residue levels were higher than harvest period but no statistical significance differences between groups ( $p>0.05$ ). When edible tissues compared among them, it was determined highest residues in skin tissue; muscle and liver tissue close to each other ( $p<0.05$ ). It was determined that natural residue levels in skin+muscle tissues were above the limit of 17 out of 25 trout samples during harvest period.

Consequently, we concluded that all facilities use enrofloxacin at different time intervals especially in the preharvest period. During harvest period it was determined 68% of residues were above the maximum residue limits.

**Key Words:** Enrofloxacin, trout, residue, HPLC

### 3. GİRİŞ

Antibiyotik terimi bakteri, mantar ve aktinomisetler gibi mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen veya sentetik olarak da hazırlanan, son derece düşük konsantrasyonlarda bile bakterilerin gelişmesini engelleyen veya onları öldüren madde olarak tanımlanır (1, 2). Balık çiftliklerinde yetiştirilen balık türlerinin artması ve yetiştiriciliğinin yoğunlaşması, hastalıkların ve dolayısıyla ilaç kullanımının artmasına neden olmuştur (3). Florokinolon grubu antibiyotikler birçok sistemik bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili olması nedeniyle balık hastalıklarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (4-7). Florokinolonlar ailesine ait bir antibiyotik olan enrofloksasin balık hastalıklarında etkili bir antibiyotik olması nedeniyle son yıllarda kullanımı dikkat çekici biçimde artmıştır (3).

Kalıntı içeren balıkları tüketen insanlarda doğrudan toksik etki veya bakteriyel direnç nedeniyle çok önemli riskler ortaya çıkabilir. Gıda değeri olan hayvanlarda antibiyotiklerin kullanılması sonucu nihai hedef olan insanların bağırsaklarında dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve özellikle bu dirençli bakterilerin toplumda yayılması sonucu tedavisi güç hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Aynı zamanda, kalıntı içeren gıdaların tüketilmesine bağlı olarak bağırsaklarda yaşayan ancak, patojen olmayan bakterilerin patojen hale geçmesine neden olarak toplum sağlığını çok daha ciddi tehdit eden sorunları beraberinde getirebilmektedir. Öyle ki dirençli mikroorganizmaların hayvanlardan insanlara doğru yayılmasının ana kaynağı gıda zinciri ile olmaktadır (8).

Dünyada ve ülkemizde gıda değeri olan hayvansal dokularda belirli antibakteriyel ajanların MKL düzeyleri belirlenmiştir (8). Ülkemizde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığınca enrofloksasinin balıklarda bulunmasına izin verilen

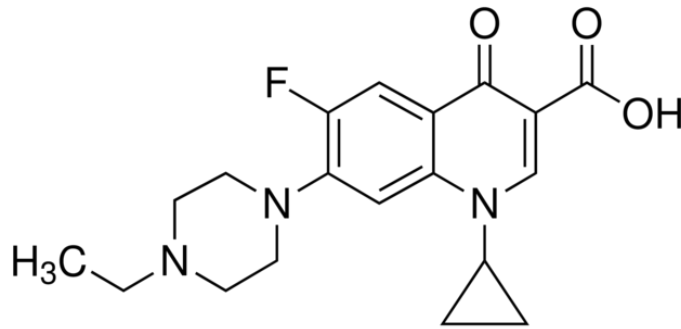
MKL düzeyleri 29.04.2011 tarihli resmi gazetede yayımlanarak 100 µg/kg olarak belirlenmiştir (9).

### 3.1. Florokinolonların Kimyasal Yapısı

Florokinolonlar, sülfonamidler ve nitrofuranlar gibi tamamen sentetik bileşiklerdir. Klinik olarak kullanımına izin verilmiş 4-kinolon yapısındaki ilk bileşik 1965 yılında piyasaya çıkmış olan nalidiksik asittir. Nalidiksik asidin keşfinden sonra bisiklik 4-kinolon yapısında 10.000'den fazla bileşik tasarlanmıştır. Klinik olarak nalidiksik asidin kullanımını sınırlayan pek çok faktör vardır. Bunlar; dar spektrum, zayıf farmakokinetik özellikler, toksik etki ve dirençli mikroorganizmalar ile ilgili sorunlardır. Kimyasal yapıda 6 pozisyonundaki hidrojen atomu yerine flor atomunun getirilmesi hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterileri de kapsayacak şekilde etki spektrumunun genişlemesine neden olmuştur. Bu etki ilacın hücre duvarından geçişinin artması ile açıklanmıştır. Ayrıca 7 pozisyonundaki metil grubuna piperazin halkasının ilavesi Gram negatif aktivitenin antipsödomonal aktiviteyi de içerecek şekilde genişlemesine yol açtığı bilinmektedir. Bu modifikasyonlar ilk geniş spektrumlu antibiyotik olan norfloksasin'in 1986'da piyasaya sürülmesine yol açmıştır. Bunlara ilaveten yapılan N-1 ve C-7 pozisyonundaki değişikliklerde etki gücünde temel değişikliklere neden olmuşlardır (2).

Örneğin; siprofloksasinin yapısı norfloksasine benzer olmakla birlikte N-1'de etil grubunun yerine siklopropilinin olması Gram pozitif ve Gram negatif aktiviteyi artırmıştır. N-1 pozisyonunda fenil halkasına sahip difloksasin'in Gram pozitif bakterilere karşı aktivitesi enfloksasine göre daha yüksektir. Difloksasin iki flor atomuna sahip olmasına karşın orbifloksasinin üç flor atomuna sahip

olması bu bileşiklerin antibakteriyel etkilerinde bir farklılığa neden olmamaktadır. Sonuç olarak, 4-kinolon molekülünün 8 pozisyonunda birçok kimyasal modifikasyon yapılmıştır. Bu değişim antibakteriyel etkinlikte ve zehirlilikte artışlara neden olmuştur. Örneğin, enrofloksasin piperazin halkasındaki etil grupları haricinde siprofloksasinle benzer molekül yapısına sahiptir. Bu grup enrofloksasinin absorpsiyonunu siprofloksasine göre artırırken ilacın antipsödomonal aktivitesini azaltmaktadır. Veteriner hekimliğinde florokinolon grubu antibiyotiklerden enrofloksasine ilave olarak sarafloksasin, orbifloksasin, difloksasin, danofloksasin ve marbofloksasin geniş bir şekilde kullanılmaktadır (2).



**Şekil 1.** Enrofloksasinin kimyasal yapısı (10).

### 3.2. Florokinolonların Etki Mekanizması

Florokinolonlar, bakterilerde stoplazmaya girerek DNA'yı negatif süpersarmal durumuna getiren DNA jiraz enzimini ve topoizomeraz IV'ü inhibe ederler. Böylece bakterinin DNA çift sarmalındaki ipliklerin birbirinden

ayrılmasını, DNA replikasyonu ile DNA transkripsiyonunu bozarlar ve DNA'yı zedelerler. Bakterilerin çoğunda asıl etki yerleri topoizomeraz IV'tür. Gram negatif bakterilerde ise florokinolonların primer etki yerleri DNA jiraz'dır. Florokinolonlar tarafından yukarıda belirtilen iki bakteriyel enzimin inhibisyonu bakteri DNA'sının replikasyonu ve transkripsiyonu için zorunlu olan pozitif süpersarmalın gevşeyip negatif süpersarmala geri dönüşünü yani açılıp kapanma olayını önlerler, böylece replikasyon ve transkripsiyon yapılması mümkün olmaz. Sonuçta florokinolonların etkisine maruz kalan bakteriler bölünemezler, anormal şekilde uzayarak veya büyüyerek ölürler (11, 12).

### 3.3. Florokinolonların Etki Spektrumu

Florokinolonlar aerobik Gram negatiflerden olan Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilere karşı yüksek düzeyde etki gösterirler. Bu bakteriler; *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus somnus*, *Mannheimia (pasteurella) haemolytica* ve *Pasteurella multocida*'dır. Enterobacteriaceae ailesi dışında ayrıca *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella spp*, *Chlamydia spp*, *Mycoplasma spp*, ve *Ureaplasma*'lara etkilidirler. *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel etki siprofloksasine bağlıdır (2). Enrofloksasin Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler ile hücre içi yerleşim gösteren Riketsiya, Klamidya ve Mikoplazma'lara karşı yüksek antibakteriyel etki göstermektedir (13, 14).

### 3.4. Florokinolonların Farmakokinetiği

Florokinolonlar tek mideli hayvanlara oral yolla uygulandığında hızlıca emilir ve uygulamayı takip eden iki saat içerisinde serumda pik yoğunluğa ( $C_{max}$ ) ulaşır. Florokinolonların biyoyararlanımı hayvan türlerine ve florokinolona göre

%30 ile 90 arasında değişir. Gıdalarla birlikte alındığında florokinolonların total serum konsantrasyonu etkilenmez, ancak serumda en yüksek konsantrasyona erişim zamanı gecikebilmektedir. Oral yolla uygulamalarda doza bağımlı bir şekilde serum konsantrasyonunda da artışlar lineer olarak artabilmektedir. Florokinolonlar emilimi takiben hidrofilik yapıları ve proteinlere düşük oranda bağlanmaları (<%50) nedeniyle iyi bir şekilde dokulara dağılırlar. Dağılım hacimleri vücut sıvıları toplamından yüksektir. Genellikle interstisyel sıvı, deri ve kemik dokudaki yoğunluk serumdaki yoğunluğun %35-100'ü kadar olmasına karşın, bronş ve prostat sıvılarındaki yoğunluk ise serumdaki yoğunluğun 2-3 katı olabilmektedir. Beyin omurilik sıvısına geçiş oranı ilaca göre değişmekle birlikte serum yoğunluğunun %25'i kadardır. Safra ve atılım organlarında (karaciğer, bağırsaklar ve idrar yolu) yüksek yoğunlukta bulunurlar. Karaciğerde kısmen metabolize olur ve metabolitlerin çoğu aktif formda safra ve idrar ile atılırlar. Enrofloksasinin ana metaboliti siprofloksasindir. Siprofloksasin birçok farklı türde oluşabilmekte ve oluşan miktarları bazı patojenler için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin üstündedir. Florokinolonların eliminasyon yarı ömrü ilaca, hayvan türüne ve doza bağlı olarak değişir. Örneğin enrofloksasinin eliminasyon yarı ömrü buzağılarda 3.6 saat iken atlarda 6.1 saate kadar çıkabilmektedir. Marbofloksasinin köpeklerde eliminasyon yarı ömrü 14 saat kadardır. Bu uzun eliminasyon yarı ömür florokinolonlarda ideal doz rejiminin 12 yada 24 saatte bir uygulanmasını gerektirmektedir. Florokinolonlar ruminantlara oral yolla uygulandığında ilaç rumende inaktif olmaktadır (2).

Balıklarda enrofloksasinin farmakokinetiği üzerine uygulama yolu (parenteral, oral, banyo), balık türü, su sıcaklığı, uygulanan doz ve uygulama



süresi gibi faktörler etki etmektedirler (15). Gökkuşığı alabalıklarına 5 ve 10 mg/kg dozlarında enrofloksasin'in damar içi uygulanmasında kararlı durum dağılım hacmi ( $V_{dss}$ ) sırasıyla 3.2 ve 2.6 L/kg düzeylerinde olduğu ve yüksek doku penetrasyonu gösterdiği belirtilmiştir. Her iki dozda da dağılım hızlı olup ilacın dağılım yarı ömrü 10 dakikadan daha az iken; eliminasyon yavaş olarak gerçekleşmekte ve eliminasyon yarı ömrü 5 mg/kg dozda 24.4 saat, 10 mg/kg dozda ise 30.4 saat olarak bildirilmiştir. Klirens ( $Cl_t$ ) 5 mg/kg dozda 92 ml/saat, 10 mg/kg dozda ise 58 ml/saat olarak bildirilmiştir. Oral yolla uygulanan enrofloksasinin biyoyararlanımı hem su sıcaklığından hem de dozdan etkilenmektedir. Eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2\beta}$ ) 10° C'de oral uygulamayı takiben yüksek dozlarda (10 ve 50 mg/kg) 29.5 saat iken; 5 mg/kg dozunda bu değerin 44 saat olduğu bildirilmiştir (16).

### 3.5. Florokinolonlarda Farmakodinamik

Farmakodinamik parametreler ilaç yoğunluğunun etkileşimi olarak tanımlanır ve bu parametreler ilacın dozuna, farmakokinetik parametrelere ve bakterileri öldürebilme yeteneğine bağlıdır. Bakterileri öldürebilme yeteneği florokinolonlarda MİK değeri ile ilişkilidir. Çünkü MİK değeri minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerinin genellikle yarısı kadardır (2). Tedavide bakteriyel patojenlere karşı maksimum etki sağlamak ve dirençli bakterilerin ortaya çıkış riskini minimuma indirmek için doz rejiminin önemi büyüktür. Bakteriyel patojenlere karşı başarı elde edebilmek için eğri altındaki alan (EAA)/MİK oranı en az 100,  $C_{max}$ /MİK oranı en az 8 olmalıdır (16).

Florokinolonlar, aminoglikozidler gibi post antibiyotik etki (PAE) gösterirler. Antibakteriyel etkinlikleri yoğunluğa ve MİK değerinin üstünde

olmasına bağlıdır. Siprofloksasin ve ofloksasin bakterilerin sabit fazında hem vücut içinde hem de vücut dışında antibakteriyel etki gösterirken norfloksasin bu fazda etki göstermez. Siprofloksasin ve fleroksasin tüm florokinolonlarda olduğu gibi DNA jiraz'ı inhibe ederken ayrıca bakterinin iç ve dış membranlarına da etki gösterir. Siprofloksasinin bakteriyel membranlar üzerindeki etkisi yoğunluğa bağlıdır. Siprofloksasin 1 mg/L dozunda bakterilerin dış membranına karşı yüksek etki gösterir ve bu miktar genellikle MİK değerinin 10 katı kadardır. Siprofloksasin 10 mg/L dozda sitoplazmik membranları parçalayıcı etki göstermektedir. Bu etki aynı zamanda sabit fazdaki bakterilere karşı antibakteriyel etkinlik oluşturur. Florokinolonların doza bağımlı etkisi aynı zamanda bir paradoksu da gösterir. Yukarıdaki yüksek dozlarda uygulandığında etkinliği azalır. Bu paradoksun mekanizması ise bakterileri öldürmek ya da inhibe etmek için gerekli olan RNA ve protein sentezinin bozulmasıdır (17).

### **3.6. Enrofloksasinin Metabolitleri**

Hem memeliler hem de memeli olmayan türlerde enrofloksasin'in ana metaboliti siprofloksasin olup, enrofloksasinin dealkilasyonu sonucu oluşmaktadır. Siprofloksasin de enrofloksasinden bağımsız olarak antimikrobiyal ajan olarak görev yapar (3, 18).

Enrofloksasinin metabolizma sonucu siprofloksasine dönüşme oranları ile ilgili olarak Weihai ve ark. (2006) hayvan türlerine göre farklılıkların olduğunu bildirmişlerdir. Çoğunluğu metabolize olmadan enrofloksasin olarak kalmakla birlikte memelilerde %23-45 arasında siprofloksasine dönüştükleri bildirilmiştir (10). Balıklarda ise enrofloksasinin siprofloksasine dönüşümü oldukça farklılık göstermektedir. Yayın balıklarında dönüşüm %5'den daha az olmaktadır. Oral

yolla enrofloksasin verilen levreklerde siprofloksasin karaciğerde tespit edilebilmiş ancak deri ve kas dokusunda tespit edilememiştir (4, 19).

### **3.7. Florokinolonlarla Diğer İlaç Etkileşimleri**

İlaçların birbirleri ile olan etkileşimleri ilaç güvenliği için oldukça önemlidir. Florokinolonlar alüminyum, magnezyum, kalsiyum, demir ve çinko gibi çok değerlikli katyonlar ile oral yolla kullanıldığında mide ve bağırsaklarda emilimi daima azalır. Bu etkileşimin mekanizması florokinolonlarla çok değerlikli katyonların kararlı şelat bileşikleri oluşturmalarıdır (20-24).

Florokinolonlar, histamin ( $H_2$ ) reseptör antagonistleri ve proton pompası inhibitörleri ile birlikte uygulandığında florokinolonların absorpsiyonuna klinik olarak etkisi olmamasına karşın florokinolonların en önemli atılım yolu olan böbreklerdeki tubuler sekresyonlarını azalttıkları bildirilmiştir (20-23).

Florokinolonlar teofilin ve kafein gibi ksantin türevlerinin klirensini inhibe edebilirler. Bu inhibe etme kapasitesi bileşiğin sitokrom P450 enzimlerinden CYP1A2 üzerine olan afinitesine bağlıdır. Genellikle teofilin metabolizmasını artırma şeklinde etkilerini gösterirler (20-23).

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlardan fenbufen ile florokinolonlar birlikte kullanıldığında yarışmalı olarak gamma aminobütirik asit (GABA) reseptörlerine bağlanmaları nedeniyle sinerjik inhibitör etki göstererek ratlarda konvülziyonların oluşmasına yol açtığı bildirilmiştir (20- 23).

Florokinolonlar antibakteriyel ilaçlardan aminoglikozidler, beta laktamlar, novobiosin ve sülfonamidlerle sinerjik etkileşim gösterirken; eritromisin,

kloramfenikol, rifampin, polimiksin ve nitrofuranlarla antagonist etkileşim göstermektedir (25).

### **3.8. Kullanım Şekli ve Dozu**

Enrofloksasin çeşitli balık türlerinde yapılan farmakokinetik çalışmalarda tedavi dozu oral ya da parenteral uygulamalar için 5-50 mg/kg'dır (3). Antibakteriyel ajanlar balıklara peritoneal boşluktan veya kas içi enjeksiyon yolu ile verilebilir. Bu yöntem balıklarda tedavi için çok etkili ve doğru bir yoldur. Ancak enjeksiyon yöntemi balıklarda strese neden olması, pahalı olması, işgücü ve zaman gerektirmesi nedeni ile rutin uygulamalar için elverişli değildir. Bu nedenle günümüzde sadece değerli anaçlarda uygulanmaktadır. Balıklarda ilaçların oral yolla uygulanması ilacın yem ile birlikte peletlenmesiyle mümkün olur. Bu yolla çok miktarda balığın daha az iş gücü ile tedavisi yapılabilir. Ancak, hasta balıkların iştahı azalmakta ve hiyerarşik davranışların sonunda antibakteriyel ilaç balıklar arasında dengesiz dağılmaktadır. Bu durumda sadece sağlıklı balıklar yem tüketmekte ve antibakteriyel ilaçlar sağlıklı olanları etkilemektedir. Banyo tarzında ilaç uygulamaları sağlıklı ve hastalıklı balıklara ilacın eşit dozda ulaşmasını sağlar. Banyo uygulamalarında küçük balıklarda kullanılabilir banyo tankının büyüklüğü sınırlayıcı bir faktördür (26).

### **3.9. Florokinolonların Kullanıldığı Yerler**

Enrofloksasin sistemik bakteriyel balık hastalıklarına karşı etkili bir ilaçtır. Özellikle sistemik enfeksiyonlardan sorumlu *Aeromonas salmonicida* (Furunkulozis), *Vibrio anguillarum* (Vibriozis), *Yersinia ruckeri* (Kızılağız) ve

*Renibacterium salmoninarum* (Bakteriyel böbrek hastalığı) etkenlerine karşı kullanılmaktadır (27, 28).

*Aeromonas salmonicida* tarafından oluşturulan Frunkulozis tüm akuatik ortamlarda %90 mortaliteye sahip akut (ani ölüm, yüzgeç tabanı ve derialtı dokularında kanama odakları) subakut ve kronik formları (kan çıbanları, ülserasyon ve skatriks alanları) yanında asemptomatik (portör) seyir gösterebilen bir hastalıktır. *V. anguillarum* 'um neden olduğu Vibriozis %50'yi aşan mortalite, letarji, iştah kaybı, yüzeysel yüzme, deride matlık, kırmızı ve ölü nekrotik alanlar ile yüzgeç ve ağız çevresinde eritemlerin şekillendiği, sistemik seyrettiğinde ise ekzoftalmus, sıvı (kanlı) dolu bağırsak, hemorajik ve şişkin karaciğerin gözleendiği bir hastalıktır. *Y.ruckeri* tarafından oluşturulan Yersinioziste sepsisemi, balıklarda durgunluk, deride kararma, yüzgeç tabanı ve anüste kanamalar, ekzoftalmus ve basınçlı kan damarları dikkati çeker. Gökkuşaağı alabalıklarında yukarıda belirtilen bakteriyel hastalık etkenlerine karşı yapılan antibiyogram testi sonuçlarına göre enrofloksasin yüksek derece duyarlı bulunmuş olup, bu hastalıkların sağaltımında kullanılmaktadır (29, 33). Bakteriyel böbrek hastalığı etkeni *Rebacterium salmoninarum* 'dur. Hastalık vücut yüzeyinde irinli kabarcıklar ile ülserlerin oluşması, böbreklerin dejenerasyonu ile karakterize kronik ve bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalık etkeni antibiyotiklere karşı yüksek oranda duyarlı değildir. Tedavi uzun zaman ve masraf gerektirmektedir. Bu nedenle hastalıkta korunma tedbirleri ön plandadır (30).

### **3.10. Florokinolonların Üstünlükleri**

Bu ilaçların önemli sayılabilecek birçok üstünlüğü vardır. Bunların bazıları şunlardır;

- Gram negatif bakterilere son derece etkilidirler; Gram-pozitif bakterilerin çoğuna ve Mikoplazma türlerine etkileri iyidir.
- Bakterileri öldürücü etkileri hızlı gelişir.
- Bakterilerin gelişmesini, üremesini engelleyen MİK ile bakterileri öldüren MBK arasındaki fark küçüktür.
- Fagositlerdeki bakteriler için etkileri iyidir; 2-4 saat süreli PAE oluştururlar.
- Plazmidlerle aracılık edilen direnç gelişmez, dirençli bakterilerin ortaya çıkış hızı yavaş, sıklığı ve oranı düşüktür.
- Diğer antibiyotiklerle aralarında çapraz direnç oluşmaz.
- Vd büyüktür.
- Önemli doku ve organlardaki düzeyleri plazmadakinden yüksektir.
- Eliminasyon yarı ömürleri uzundur.
- Plazma proteinlerine düşük oranda bağlanırlar.
- Hayvanların tahammülü genellikle iyidir.
- Uygulama yerlerinden iyi emilir (1).

### **3.11. Gıdalarda Kalıntı**

Avrupa Tıbbi Ürünler Değerlendirme Ajansı (EMA) tarafından enrofloksasin'in hayvansal gıdalarda bulunmasına müsaade edilen MKL Haziran 2002'de EMA/MRL/820/02 sayılı özet raporu ile yayımlanmıştır. Türkiye'de ise Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na enrofloksasinin hayvansal gıdalarda

bulunmasına izin verilen MKL belirlenerek 29.04.2011 tarih ve 27919 sayılı resmi gazetede yayımlanmıştır. Her iki kuruluştaki da balıklarda bulunmasına izin verilen limit enrofloksasin için; kas ve derinin doğal oranlarıyla ve metaboliti olan siprofloksasin ile birlikte 100 µg/kg olarak belirlenmiştir (9, 31). Enrofloksasinin hayvan türlerine ve dokularına göre belirlenen MKL değerleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Bu çalışmada, veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan florokinolon grubu antibiyotiklerden enrofloksasinin alabalıklardaki kalıntı durumu araştırılmıştır. Gıda güvenliği ve toplum sağlığı açısından yapılan çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla Elazığ ilinde üretim yapan 5 farklı işletmeden temin edilen alabalıkların hasat öncesi ve hasat dönemi deri, kas ve karaciğer dokularındaki enrofloksasin düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Tablo 1.** Türk gıda kodeksine göre enrofloksasinin hayvan türlerine ve dokularına göre bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı miktarları.

| Farmakolojik Aktif Madde | Belirleyici Kalıntı                     | Hayvan Türü                                   | MKL       | Hedef Doku  | Diğer Koşullar                                                          |
|--------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------|-------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Enrofloksasin            | Enrofloksasin ve siprofloksasin toplamı | Sığır<br>koyun<br>keçi                        | 100 µg/kg | Kas         | Kas için verilen MKL, balıklarda kas ve derinin doğal oranları içindir. |
|                          |                                         |                                               | 100 µg/kg | Yağ         |                                                                         |
|                          |                                         |                                               | 300 µg/kg | Karaciğer   |                                                                         |
|                          |                                         |                                               | 200 µg/kg | Böbrek      |                                                                         |
|                          |                                         |                                               | 100 µg/kg | Süt         |                                                                         |
|                          |                                         | Domuz<br>Tavşan                               | 100 µg/kg | Kas         | Yağ, karaciğer ve böbrek için verilen MKL balıkta uygulanmaz.           |
|                          |                                         |                                               | 100 µg/kg | Yağ         |                                                                         |
|                          |                                         |                                               | 200 µg/kg | Karaciğer   |                                                                         |
|                          |                                         |                                               | 300 µg/kg | Böbrek      |                                                                         |
|                          |                                         | Kanatlı<br>hayvanlar                          | 100 µg/kg | Kas         | Yağ için verilen MKL, domuzlarda yağ ve derinin doğal oranları içindir. |
|                          |                                         |                                               | 100 µg/kg | Deri ve Yağ |                                                                         |
|                          |                                         |                                               | 200 µg/kg | Karaciğer   |                                                                         |
|                          |                                         |                                               | 300 µg/kg | Böbrek      |                                                                         |
|                          |                                         | Diğer<br>gıda elde<br>edilen<br>tüm<br>türler | 100 µg/kg | Kas         | Yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmaz.             |
|                          |                                         |                                               | 100 µg/kg | Yağ         |                                                                         |
|                          |                                         |                                               | 200 µg/kg | Karaciğer   |                                                                         |
|                          |                                         |                                               | 200 µg/kg | Böbrek      |                                                                         |



## **4. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **4.1. Gereç**

#### **4.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Asetonitril, enrofloksasin, metanol, (Sigma-Aldrich, Fransa), hidroklorik asit, ortofosforik asit, potasyum dihidrojen fosfat (Merck, Almanya), sodyum hidroksit (Kimetsan, Türkiye).

#### **4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar**

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi LC-20 AT (Schimadzu, Japonya)

Kolon ODS-3 5µm 4.6x250mm (Inertsil, Japonya)

Manyetik Karıştırıcı (Magnetomix Colora, USA)

Bidistile su cihazı (GFL 2104, Almanya)

Hassas terazi (Denver Instrument Apx-153 Almanya)

Homojenizator (Ika Ultra-Turrax T25, Almanya)

Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320 AR, Almanya)

Soğutucu -20°C (Arçelik 2553 D, Türkiye)

Diğer rutin laboratuvar malzemeleri

#### **4.1.3. Hayvan Materyali**

Elazığ'daki 5 farklı alabalık işletmesinden 5'er adet olmak üzere toplam 25 adet hasat öncesi (ortalama 50±10g ağırlığında), 25 adet hasat dönemi olmak üzere (ortalama 250±40 g ağırlığında) toplam 50 adet alabalık toplandı. Alabalıklar 2011 yılı kasım ayında Keban ile Karakaya Barajı arasındaki mevki

ile Keban baraj gölünde faaliyet gösteren işletmelerden alındı. Toplanan bu numuneler analiz edilinceye kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

## **4.2. Yöntem**

### **4.2.1. Standart Hazırlama**

Enrofloksasin standardından 5 mg tartıldı. 50 ml 0.7 M HCl solüsyonu ile manyetik karıştırıcıda tamamen çözülünceye kadar karıştırılarak 100 µg/ml’lik ana stok standart hazırlandı.

Ana stok standart solüsyonundan 0.7 M HCl ile seyreltmeler yapılarak 5, 1, 0.1 ve 0.01 µg/ml’lik çalışma standart solüsyonlar hazırlandı ve +4 °C’de muhafaza edildi.

### **4.2.2. Ekstraksiyon İşlemi**

Dokularda enrofloksasinin ekstraksiyon işlemi Koç (2002) tarafından kullanılan metot modifiye edilerek yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda yöntemin geri kazanımının %80 olduğu bulunmuştur.

Her alabalıktan 1 g deri, 1 g kas ve 0.2 g karaciğer dokusu alındı. Deri ve kas dokuları 2 ml, karaciğer ise 1 ml 0.7 M HCl ile homojenize edildi. Homojenat 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra C<sub>18</sub> kartuştan 2 ml metanol vakum yardımıyla geçirilip, metanol uzaklaştırıldı. Kartuştan sırasıyla, deri ve kas için 1 ml süpernatant 1 ml metanol ve 0.8 ml elüsyon seyreltme çözeltisi (0.01 M potasyum dihidrojen fosfat ile metanol 1/1 oranında ve pH 2.5), karaciğer için 0,5 ml süpernatant, 0,5 ml metanol ve 0.4 ml elüsyon seyreltme çözeltisi geçirilerek tüpte toplandı. Toplanan ekstrakt 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant 0.45 µm’lik filtreden geçirilerek 20 µl’si HPLC’ye enjekte edildi.

#### **4.2.3. HPLC Sistem**

Mobil faz için asetonitril (%16.25) ile 0.1 M ortofosforik asit (%83.75) karışımı hazırlandı. Sodyum hidroksit ile pH 3.6' ya ayarlandı. Mobil fazın akış hızı 1 ml/dk, fırın sıcaklığı ise 40 °C olarak ayarlandı. Dedektör olarak floresan dedektör kullanıldı. Dalga boyları, eksitasyon 280 nm ve emisyon 450 nm olarak ayarlandı. Ayarlanan sisteme standart ve numuneler 20 µl enjekte edildi. Standart ve numunelerdeki pikler ile geliş zamanına ait kromotogram görüntüleri kaydedildi. Standart solüsyon ile kalibrasyonları yapılarak numunelerdeki enrofloksasin miktarları belirlendi.

#### **4.2.4. İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS için Windows 17.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normallik analizleri yapıldı. Veriler parametrik test koşullarını karşılayamadığından nonparametrik testler yapıldı. Alabalıkların hasat öncesi ve hasat dönemi doku enrofloksasin farklılıkları için Mann Witney U testi yapıldı. Her dönem kendi içerisinde dokular arası fark için Kruskal Wallis testi yapıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma ( $\bar{X} \pm Sd$ ) olarak ifade edildi ve  $p < 0.05$  olanlar istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

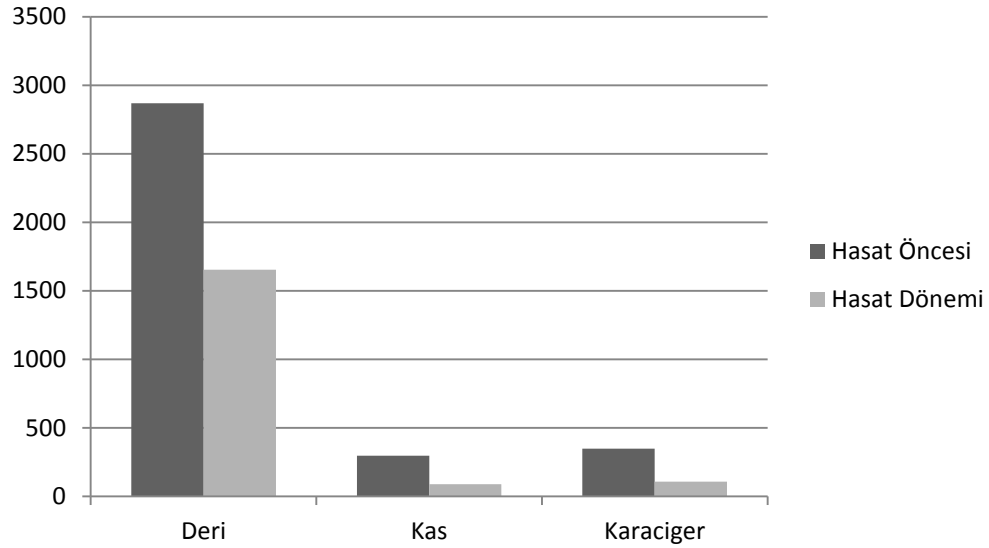
## 5. BULGULAR

Çalışmada analizleri yapılan alabalıklarda deri, kas ve karaciğer numunelerine ait enrofloksasin miktarları Tablo 2’de gösterilmiştir. Hasat öncesi döneme ait numunelerde tüm işletmelerde ve bütün dokularda enrofloksasin varlığı saptanmıştır. Hasat döneminde ise sadece 1 işletmede enrofloksasin saptanmamış, diğer 4 işletmede ise enrofloksasin tespit edilmiştir.

**Tablo 2.** Hasat öncesi ve hasat dönemi alabalıklarda tespit edilen enrofloksasin miktarları (ng/g).

| İşletme No | Hasat Öncesi |       |      |           | Hasat Dönemi |      |     |           |
|------------|--------------|-------|------|-----------|--------------|------|-----|-----------|
|            | Numune No    | Deri  | Kas  | Karaciğer | Numune No    | Deri | Kas | Karaciğer |
| 1          | 1            | 2413  | 631  | 345       | 1            | 1052 | 47  | 126       |
|            | 2            | 10935 | 2205 | 2258      | 2            | 770  | 61  | 167       |
|            | 3            | 1491  | 296  | 272       | 3            | 421  | 26  | 33        |
|            | 4            | 8972  | 1422 | 1106      | 4            | 2289 | 68  | 147       |
|            | 5            | 4244  | 639  | 863       | 5            | 1694 | 121 | 108       |
| 2          | 6            | 29    | 3    | 27        | 6            | 353  | 87  | 222       |
|            | 7            | 22    | 3    | 18        | 7            | 13   | 0   | 1         |
|            | 8            | 14    | 4    | 17        | 8            | 175  | 111 | 181       |
|            | 9            | 18    | 3    | 7         | 9            | 232  | 134 | 336       |
|            | 10           | 22    | 4    | 18        | 10           | 63   | 34  | 72        |
| 3          | 11           | 9764  | 654  | 960       | 11           | 5036 | 191 | 74        |
|            | 12           | 8355  | 160  | 475       | 12           | 5455 | 207 | 116       |
|            | 13           | 8325  | 377  | 364       | 13           | 8171 | 234 | 120       |
|            | 14           | 9336  | 497  | 1065      | 14           | 2090 | 138 | 83        |
|            | 15           | 6989  | 431  | 433       | 15           | 5791 | 339 | 262       |
| 4          | 16           | 154   | 17   | 19        | 16           | 1010 | 67  | 98        |
|            | 17           | 11    | 5    | 18        | 17           | 948  | 68  | 168       |
|            | 18           | 77    | 10   | 26        | 18           | 1839 | 107 | 160       |
|            | 19           | 76    | 9    | 23        | 19           | 1591 | 74  | 56        |
|            | 20           | 73    | 13   | 14        | 20           | 716  | 41  | 84        |
| 5          | 21           | 45    | 8    | 76        | 21           | 0    | 0   | 0         |
|            | 22           | 61    | 11   | 84        | 22           | 0    | 0   | 0         |
|            | 23           | 76    | 11   | 59        | 23           | 0    | 0   | 0         |
|            | 24           | 149   | 17   | 122       | 24           | 0    | 0   | 0         |
|            | 25           | 45    | 12   | 71        | 25           | 0    | 0   | 0         |

Hasat öncesi ve hasat dönemi analizlerde deri dokusu enrofloksasin düzeyi kas ve karaciğer dokularına göre önemli düzeylerde yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Hasat öncesi ve hasat dönemi deri, kas ve karaciğer dokularındaki ortalama enrofloksasin miktarları Şekil 2 ve Tablo 3’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.** Hasat öncesi ve hasat dönemi tüm işletmelerdeki alabalıklarda deri, kas ve karaciğer dokularındaki ortalama enrofloksasin miktarları (ng/g).

**Tablo 3.** Hasat öncesi ve hasat dönemi tüm işletmelerdeki alabalıklarda deri, kas ve karaciğer dokularındaki enrofloksasin miktarlarının karşılaştırılması (ng/g)

|              | Deri                     | Kas                    | Karaciğer              |
|--------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| Hasat öncesi | 2868 ± 4036 <sup>a</sup> | 298 ± 524 <sup>b</sup> | 350 ± 534 <sup>b</sup> |
| Hasat dönemi | 1654 ± 2212 <sup>a</sup> | 90 ± 85 <sup>b</sup>   | 109 ± 87 <sup>b</sup>  |

<sup>a,b</sup> Aynı satırda yer alan a ve b harfleri ile gösterilen gruplar arasındaki fark önemlidir ( $p<0.05$ ).

Hasat dönemi alabalıklarda kas ve derinin doğal oranlarındaki enrofloksasin miktarları MKL'ne göre gruplandırılarak Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Hasat dönemi alabalıklarda MKL üzerindeki miktarlar (adet).

| 1.İşletme | 2.İşletme | 3.İşletme | 4.İşletme | 5.İşletme | Toplam |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
| 4         | 3         | 5         | 5         | 0         | 17     |

İşletmelerde hasat öncesi ve hasat döneminde bulunan ortalama enrofloksasin miktarları ve minimum-maksimum değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** İşletmelerde tespit edilen ortalama enrofloksasin miktarları ile minimum ve maksimum değerleri ng/g (  $\bar{X} \pm Sd$  ).

| <b>Dönem</b>            | <b>Doku</b> | <b>1.</b>        | <b>2.</b>      | <b>3.</b>        | <b>4.</b>       | <b>5.</b>      |
|-------------------------|-------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|----------------|
|                         |             | <b>İşletme</b>   | <b>İşletme</b> | <b>İşletme</b>   | <b>İşletme</b>  | <b>İşletme</b> |
| <b>Hasat<br/>Öncesi</b> | Deri        | <b>5611±4144</b> | <b>21±6</b>    | <b>8553±1074</b> | <b>78±51</b>    | <b>75±43</b>   |
|                         |             | 1491-10935       | 14-29          | 6989-9764        | 11-154          | 45-149         |
|                         | Kas         | <b>1038±772</b>  | <b>3±0.5</b>   | <b>423±180</b>   | <b>11±4</b>     | <b>12±3</b>    |
|                         |             | 296-2205         | 3-4            | 160-654          | 5-17            | 8-17           |
|                         | Karaciğer   | <b>968±801</b>   | <b>17±7</b>    | <b>659±326</b>   | <b>20±5</b>     | <b>82±24</b>   |
|                         |             | 272-2258         | 7-27           | 364-1065         | 14-26           | 71-122         |
| <b>Hasat<br/>Dönemi</b> | Deri        | <b>1245±747</b>  | <b>167±135</b> | <b>5038±2172</b> | <b>1220±472</b> |                |
|                         |             | 421-2289         | 13-353         | 2090-8171        | 716-1839        | 0              |
|                         | Kas         | <b>64±51</b>     | <b>73±55</b>   | <b>221±74</b>    | <b>71±24</b>    |                |
|                         |             | 26-121           | 0-134          | 138-339          | 41-107          | 0              |
|                         | Karaciğer   | <b>116±35</b>    | <b>162±130</b> | <b>131±76</b>    | <b>113±49</b>   |                |
|                         |             | 33-167           | 1-336          | 74-262           | 56-168          | 0              |



## 6. TARTIŞMA

Alabalık yetiştiriciliğinde hastalık etkenlerinin enrofloksasine karşı duyarlılıklarının yüksek olması birçok hastalığın sağaltımında enrofloksasini oldukça önemli kılmaktadır (33, 34). Bu çalışmada Elazığ ilindeki alabalık işletmelerinde enrofloksasinin balıklardaki kalıntı düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla 5 farklı alabalık işletmesinden 25 adet hasat öncesi ve 25 adet hasat dönemi olmak üzere toplam 50 adet alabalık numunesi toplanmıştır. Alabalıkların deri, kas ve karaciğer doku örneklerinde enrofloksasin kalıntıları HPLC’de analiz edilmiştir.

Enrofloksasinin biyolojik numunelerdeki miktarının tespiti ile ilgili birçok metot bulunmaktadır. Bu metotlar HPLC, LC-MS, LC-MS/MS, ELISA testi ve elektroforezis’dir (35, 36). Balıklarda enrofloksasin miktarlarının tespitinde birçok araştırmada olduğu gibi (3-5, 8, 15) bu çalışmada da enrofloksasin miktarları floresan dedektör kullanarak HPLC’de gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda tespit limitlerinin 0,2-10 ng/g doku aralığında olduğu, geri kazanımlarını ise Dario ve ark. (2004) % 90-102, Intorre ve ark. (2000) % 65-80 olarak belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise geri kazanım %80 olarak tespit edilmiş olup yukarıdaki araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığınca balıklarda kullanıma onaylı 2 adet ruhsatlı enrofloksasin preparatı bulunmaktadır. Balıklarda enrofloksasinin kullanımına ilk olarak 05.04.2011 tarihinde izin verilmiştir. Balıklar için enrofloksasinin onaylı ticari müstahzarları yokken kanatlı preparatlarının kullanıldığı yetiştiriciler tarafından bildirilmiştir (33, 37). Yapılan analizlerde hasat öncesi tüm işletmelerde enrofloksasin varlığına rastlanılmıştır. Hasat

döneminde ise 4 işletmede tespit edilip 1 işletmede tespit edilememiştir. Tüm işletmelerin ortalaması alındığında hasat öncesi enrofloksasin miktarlarının, hasat dönemine göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 2). Bu bulgu balık yetiştiriciliğinde hastalıkların genellikle erken dönemde görülmesi, hasat döneminde ilaç kullanımının olmaması veya az olması ile açıklanabilir. Elde edilen bulgular hasat öncesi dönemde görülmesi muhtemel hastalıklar ve tedavi durumları göz önüne alındığında normal sonuçlar olarak kabul edilebilir.

Atlantik salmonlarında (10 °C su sıcaklığında) enrofloksasinin eliminasyon yarı ömrü 34.2 saat olduğu, oksolinik asit, flumekuın ve sarafloksasinin ise eliminasyon yarı ömrünün 24 saatten daha az olduğu bildirilmiştir (5). Enrofloksasinin 10 mg/kg doz'da (12 °C su sıcaklığında ve 5 gün boyunca) Gökkuşığı alabalıklarına oral yolla uygulanması sonucunda kas ve derinin doğal oranlarında MKL olan 100 µg/kg miktarına ancak 59. günde düştüğü bildirilmiştir. Metaboliti olan siprofloksasin ise 20. günden sonra tespit edilememiştir (3). Her iki araştırmacının bulgularına göre enrofloksasinin balıklardan eliminasyonu uzun sürmektedir. Yapılan bu çalışmada da rastgele bir zaman diliminde işletmelerden temin edilen numunelerde enrofloksasin varlığına rastlanması bu antibiyotiğin sıklıkla kullanılabildiği ihtimalini göstermektedir.

Enrofloksasinin oral uygulamalarında Atlantik salmonlarında enrofloksasin miktarı 120. saate kadar deride artarken, kas dokusunda ise azalmakta olduğu bildirilmiştir (13). Kral somon balıklarına (*oncorhynchus ishawytscha*) oral yolla 75 mg/kg dozda oksitetrasiklin uygulanmıştır. Uygulamadan sonraki 1, 22 ve 43. günlerde deri dokusundaki oksitetrasiklin miktarı kas dokusundan daha yüksek bulunmuştur (38). Hayvansal gıdalarda deri insanlar tarafından tüketilmemesine

karşın balıklarda deri genellikle tüketilmektedir. Banyo tarzı ilaç uygulamalarında derinin ilaca ilk maruz kalınan bölge olması, deri dokusunda enrofloksasinin eliminasyonunun yavaş olması nedeniyle kalıntı miktarının yüksek olması kaçınılmazdır. Bu çalışmada hasat öncesi ve hasat döneminde derideki enrofloksasin miktarının kas ve karaciğer dokusundan daha fazla olduğu görülmektedir. Bu çalışmanın bulguları yukarıdaki araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Oral yolla enrofloksasin verilen Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)’larda karaciğerdeki enrofloksasin miktarı kas dokusundan yüksek bulunmuştur (10). Yine oral yolla enrofloksasin uygulanmış Moskova ördeklerinde de karaciğerdeki enrofloksasin yoğunluğu kas dokusundan yüksek bulunmuştur (39). Bu çalışmada da alabalıklarda hasat öncesi ve hasat dönemi karaciğerdeki ortalama enrofloksasin miktarı kas dokusuna göre yüksek bulunmuş ancak istatistiksel bir fark görülmemektedir ( $p>0.05$ ). Karaciğerdeki enrofloksasin miktarının yüksek olması atılımının bir kısmının safra ile olması, ilacın karaciğerde biyotransformasyona uğraması ve oral yolla alınan ilacın karaciğerden geçtikten sonra diğer organlara dağılması gibi nedenlere bağlı olabilir.

Enrofloksasinin karaciğerde siprofloksasine dönüşümü köpeklerde %40, piliçlerde %30, ineklerde %29.9 ve keçilerde ise %28.8 oranlarında olduğu bildirilmektedir (40, 41). Yayın balıklarında enrofloksasinin siprofloksasine %5’den daha az dönüştüğünü bildirilmiştir (19).

Oral yolla enrofloksasin verilen levreklerde siprofloksasin karaciğerde tespit edilmiş ancak deri ve kas dokusunda tespit edilememiştir (4). Dere alabalıklarında (*Salmo trutta fario*) enrofloksasinin oral ve intra venöz yolla 10

mg/kg dozda uygulanmasında 120 saate kadar yapılan plazma analizlerinde siprofloksasin tespit edilememiştir (28). Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) oral yolla 10 mg/kg dozunda enrofloksasin uygulanmış deri ve kas dokusunun doğal oranlarındaki enrofloksasin ve siprofloksasin oranı en yüksek 4. günde %6.7 (sırasıyla  $8.41 \pm 2.83$  ve  $0.57 \pm 0.24$  mg/kg) olarak bulunmuştur (3). Bu çalışmada deri ve kas dokusu analizleri ayrı ayrı yapılmıştır. Alabalıklarda deri dokusu kas dokusunun yaklaşık %10'u kadardır (42). Hasat dönemi alabalıklarda %10'luk oran dikkate alındığında 25 adet numuneden 17 adedi MKL üstünde tespit edilmiştir. Bu çalışmada siprofloksasin analizleri yapılmamıştır. Ancak sonuçlara %5 siprofloksasin eklendiğinde bile MKL üzerindeki numune sayısında herhangi bir değişiklik olmamaktadır.

Sonuç olarak, analiz edilen alabalıklardan hasat öncesi dönemin tamamında, hasat döneminde ise 5 işletmenin 4'ünde enrofloksasin varlığı tespit edilmiştir. Hasat dönemi alabalıkları incelendiğinde yenilebilir deri ve kas dokusu enrofloksasin düzeylerinin 25 numuneden 17'sinde MKL düzeylerinin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Oldukça yüksek düzeylerde üretimi ve tüketimi yapılan alabalıklarda bu kalıntılar insan sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji 2. Cilt, 1. Baskı, Ankara, Medisan, 2000.
2. Prescott JF, Baggot JD, Walker RD. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Low State University Press, 3.Edition, 2000.
3. Dario L, Laura F, Emilio G, et al. Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004; 3912-3917.
4. Intorre L, Cecchini S, Bertini S, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*) Aquaculture 2000; 182: 49-59.
5. Martinsen B and Horsberg ET. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10 °C. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1995; 1059-1064.
6. Schneider MJ, Darwish MD, Freeman WD. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Analytica Chimica Acta 2007; 586: 269-274.
7. Kim MS, Lim JH, Park BK, Hwang YH, Yun Hİ. Pharmacokinetics of enrofloxacin in Korean catfish (*Silurus asotus*). J Vet Pharmacol Therap 2006; 29: 397-402
8. Canada-Canada F, Espinosa-Mansilla A, Jimenez Giron A, Munoz de la pena A. Simultaneous determination of the residues of fourteen quinolones and fluoroquinolones in fish samples using liquid chromatography with photometric and fluorescence detection. Czech J Food Sci 2012; 30 (1): 74-82.
9. Resmi gazete hayvansal gıdalarda bulunabilecek veteriner ilaçlarına ait farmakolojik aktif maddelerin sınıflandırılması ve maksimum kalıntı limitlerinin belirlenmesi hakkında tebliği (Tebliğ No:2011/20) Resmi Gazete yayım tarihi 29.04.2011; Resmi Gazete sayısı 27919
10. Weihai Xu, Xiaobin Zhu, Xinting W, Liping D, Gan Z. Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Aquaculture 2006; 254: 1-8.
11. Martinez M, Mcdermott P, Walker R. Pharmacology of the fluoroquinolones a perspective for the use in domestic animals. The Veterinary Journal 2006; 172: 10-28.
12. Kayaalp O. Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1.Cilt, 13.Baskı, Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2012.
13. Stoffregen DA, Wooster GA, Bustos PS, Bowser PR, Babish JG. Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon. J Vet Pharmacol Therap 1997; 20: 111-123.
14. Mitchell MA. Therapeutic review enrofloxacin. Journal of Exotic Pet Medicine 2006; 15(1): 66-69.

15. Vesna D, Baltic M, Cirkovic M, et al. Quantitive and qualitive determination of enrofloxacin residues in fish tissues. *Acta Veterinaria (Beograd)* 2009; (59) 5-6: 579-589.
16. Samuelsen OB. Pharmacokinetics of quinolones in fish a review. *Aquaculture* 2006; 255: 55-75
17. Lode H, Borner K, Koeppe P. Pharmacodynamics of fuoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 27: 9-33.
18. Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 2003; 52: 1233-1244
19. Danyı S, Wıdart J, Douny C, et all. Determination and kinetics of enrofloxacin and ciprofloksasin in Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and giand freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) using a liquid chromatography/mass spectrometry method *J Vet Pharmacol Therap* 2010; 34: 142-152.
20. Filazi A. Kanatlılarda bazı iki değerli iz minerallerin florokinolon grubu antibakteriyel ilaçların ağızdan biyoyararlanımı üzerine etkileri Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1995.
21. Douglas NF. Flouroquinolone adverse effects and drug interactions *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 2001; 21: 253-272
22. Yılmaz O, Özbek H. Bazı kinolonların santral sinir sistemi etkileri ile etomitad ve teofilinle etkileşimlerinin motor aktivite testleriyle belirlenmesi. *Van Tıp Dergisi* 2001; 8(1).
23. Anonim “Fluoroquinolones veteriner-systemic”  
<http://vetmed.tamu.edu/common/docs/public/aavpt/fluoroquinolones.pdf>. 22.10.2013.
24. Budiatin AS, Wahyuni N, Suharyono, Aryani T, Effect of  $Al(OH)_3$  and  $Mg(OH)_2$  suspesion dosage form on the absorbtion of oral ciprofloxacin. *Majalah Farmasi Airlangga* 2008; 6 (1).
25. Akkan HA, Karaca M, Veteriner iç hastalıklarında antibiyotiklerin kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2003; 14(2): 72-77.
26. Samuelsen OB, Lunestad BT. Bath treatment an alternative method for the administration of the quinolones flumequine and oxolinic acid to halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and in vitro antibacterial activity of the drugs against some *Vibrio* sp. *Diseases of Aquatic organisms* 1996; 27: 13-18.
27. Rocca GD, Salvo AD, .Malvisi J, .Sello M. The disposition of enrofloxacin in seabream (*Sparus aurata* L.) after single intravenous injection or from medicated feed administration. *Aquaculture* 2004; 232: 53-62.
28. Koç F, Uney K, Atamanalp M, Tümer İ, Kaban G, Pharmacokinetic disposition of enrofloksasin in Brown trout (*Salmo trutta fario*) after oral and intravenous administrations. *Aquaculture* 2009; 25: 142-144.

29. Akşit D, Kum C, Gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'ında sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2008; 19(1): 1-7
30. Türk N. "Bakteriyel böbrek hastalığı (Bacterial kidney disease)" <http://www.bornovavet.gov.tr/bakteriyelbobrek>. 03.01.2014
31. EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medical Products Veterinary medicines and Inspections). Enrofloxacin (Extension to all food producing species) summary report January 2002 EMEA/MRL/820/02 Final.
32. Koç F. Ankara ve çevresindeki mezbahalardan elde edilen sığır ve koyunların et, karaciğer ve böbreklerinde bazı kinolon grubu antibakteriyel ilaç kalıntılarının incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2002.
33. Mefut A, Emre Y, Diler Ö, Altun S, İnce İ. Akdeniz bölgesindeki bazı gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde bakteriyel balık patojenlerinin kontrolü. Türk Sucul Yaşam Dergisi 2007; 5-8: 9-18.
34. Özkök S. Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) görülen önemli bakteriyel etkenlerin tespiti ve antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2005; 16: 1-2.
35. Zhao Y, Zhang G, Liu Q, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues. J Agric Food Chem 2008; 56: 12138-12142.
36. Horstkötter C, Lozano EJ, Barron D, Barbosa J, Blaschke G. Determination of residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in chicken muscle by capillary electrophoresis using laser induced fluorescence detection. Electrophoresis 2002; 23: 3078-3083.
37. Aydın S, Gültepe N, Çiltaş A. Çanakkale ilinde bir gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) işletmesinde *Pseudomonas* sp. enfeksiyonu. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2005; 36(1): 39-43.
38. Namdari R, Abedini S. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline seawater chinook and coho salmon following medicated-feed treatment. Aquaculture 1996; 144: 27-38.
39. Intorre L, Mengozzi G, Bertini S, et al. The plasma kinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in the muscovy duck. Veterinary Research Communications 1997; 21: 127-136.
40. Qian JG, Ling LH, Ke F, et al. Population pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in chicken based on retrospective data, incorporating first-pass metabolism. J Vet Pharmacol Therap 2009; 33: 84-94.
41. Cester CC, Toutain PL. A Comprehensive model for enrofloxacin to ciprofloxacin transformation and disposition in dog. Journal of Pharmaceutical Sciences 1997; 86(10).
42. Korkmaz AŞ, Kırkağaç M. Tatlı suda beton havuzlarda ve denizde ağ kafeslerde yetiştirilen gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) et verimi, vücut

kompozisyonu ve enerji kapsamı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi 2008; 14 (4): 409-413



## 8. ÖZGEÇMİŞ

12.01.1979 tarihinde Hatay'ın Yayladağı ilçesi Kışlak köyünde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimini 1996'da Antakya'da tamamladım. 1997'de Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne başlayıp 2002'de mezun oldum. Mezun olduktan sonra tavukçuluk sektöründe çalışmaya başladım. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Muş Tarım İl Müdürlüğü'nde 2005 yılı Eylül ayında Veteriner Hekim olarak göreve başladım. 2009 yılı Ağustos ayından itibaren halen Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nde Veteriner Hekim olarak görev yapmaktayım.