



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI



**ANTİMİKROBİYAL İLAÇ KALINTILARININ DANALARIN
KESİM ÖNCESİ VE SONRASI BİYOLOJİK
ÖRNEKLERİNDE BIOCHIP ARRAY TEKNİĞİ İLE
BELİRLENMESİ**

Meltem ÇAYCI

DOKTORA TEZİ

BURSA-2021





T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI



**ANTİMİKROBİYAL İLAÇ KALINTILARININ DANALARIN
KESİM ÖNCESİ VE SONRASI BİYOLOJİK
ÖRNEKLERİNDE BIOCHIP ARRAY TEKNİĞİ İLE
BELİRLENMESİ**

Meltem ÇAYCI

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ

BAP Üniversite ve Sektör İşbirliği Projesi ÜSİP (V)-2014/8

BURSA-2021

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

“Antimikrobiyal İlaç Kalıntılarının Danaların Kesim Öncesi ve Sonrası Biyolojik Örneklerinde Biochip Array Tekniği ile Belirlenmesi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Meltem ÇAYCI
29/09/2021

TEZ KONTROL BEYAN FORMU

29/09/2021

Adı Soyadı: Meltem ÇAYCI

Anabilim Dalı: Veteriner-Farmakoloji ve Toksikoloji

Tez Konusu: Antimikrobiyal İlaç Kalıntılarının Danaların Kesim Öncesi ve Sonrası Biyolojik Örneklerinde Biochip Array Tekniği ile Belirlenmesi

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	√	<input type="checkbox"/>
Dış Kapak Sayfası	√	<input type="checkbox"/>
İç Kapak Sayfası	√	<input type="checkbox"/>
Kabul Onay Sayfası	√	<input type="checkbox"/>
Sayfa Düzeni	√	<input type="checkbox"/>
İçindekiler Sayfası	√	<input type="checkbox"/>
Yazı Karakteri	√	<input type="checkbox"/>
Satır Aralıkları	√	<input type="checkbox"/>
Başlıklar	√	<input type="checkbox"/>
Sayfa Numaraları	√	<input type="checkbox"/>
Eklerin Yerleştirilmesi	√	<input type="checkbox"/>
Tabloların Yerleştirilmesi	√	<input type="checkbox"/>
Kaynaklar	√	<input type="checkbox"/>

DANIŞMAN ONAYI

Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Veteriner Hekimliğinde Antimikrobiyal İlaç Kullanımı.....	7
2.2. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Gruplar.....	8
2.2.1. Beta Laktamlar.....	8
2.2.1.1. Penisilinler.....	8
2.2.1.2. Sefalosporinler.....	9
2.2.2. Makrolidler.....	10
2.2.3. Tetrasiklinler.....	11
2.2.4. Kinolonlar.....	12
2.2.5. Amfenikoller.....	13
2.3. Hayvansal Gıdalarda Kalıntı Oluşumuna Neden Olan Faktörler.....	13
2.4. İlaç Kalıntılarının Neden Olduğu İstenmeyen Etkiler.....	16
2.4.1. Antimikrobiyal Direnç Gelişimi.....	17
2.4.2. Alerjik Reaksiyonlar.....	17
2.4.3. Toksik Etkiler.....	18
2.4.4. İntestinal Mikroflora Üzerine Etkileri.....	19
2.4.5. Gıda Endüstrisine Etkileri.....	20
2.4.6. Ekosistem Üzerine Etkileri.....	20
2.5. Gıdalardaki İlaç Kalıntılarına Toplumsal Yaklaşım.....	21
2.6. Antibiyotik Kalıntılarına İlişkin Yasal Düzenlemeler ve Kalıntı Kontrolü.....	22
2.7. Antimikrobiyal Kalıntı Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Gereç.....	28
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Deney ve Kontrol Grubu Hayvanlar.....	28
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyaller ve Uygulanma Prosedürleri.....	28
3.1.3. Numunelerin Toplanması.....	29
3.1.4. Analizlerde Kullanılan Kitler.....	30
3.1.5. AM-II ve BLACT Analizlerinde Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Hazırlanması.....	31
3.1.6. Analizlerde Kullanılan Alet ve Ekipmanlar.....	32
3.1.7. Kullanılan İlaç Standartları.....	32
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Numunelerin Hazırlanması.....	33
3.2.2. Ekstraksiyon Yöntemleri.....	33
3.2.2.1. Serum Ekstraksiyon Yöntemleri.....	33
3.2.2.1.1. AM-II Analizi Ekstraksiyon Yöntemi.....	33
3.2.2.1.2. BLACT Analizi Ekstraksiyon Yöntemi.....	33

3.2.2.2. Ağız Sıvısı Ekstraksiyon Yöntemleri.....	34
3.2.2.2.1. AM-II Analizi Ekstraksiyon Yöntemi.....	34
3.2.2.2.2. BLACT Analizi Ekstraksiyon Yöntemi.....	34
3.2.2.3. Dışkı ve Doku Ekstraksiyon Yöntemleri.....	34
3.2.2.3.1. AM-II Analizi Ekstraksiyon Yöntemi.....	34
3.2.2.3.2. BLACT Analizi Ekstraksiyon Yöntemi.....	34
3.2.3. AM II ve BLACT Yöntemine Ait Validasyonlar.....	34
3.2.4. AM II ve BLACT Kitlerinin Analiz Prosedürü.....	36
3.2.5. AM II ve BLACT Kitlerinin Görüntüleme Okutma İşlemi.....	37
3.2.6. LC-MS/MS Analizleri.....	37
3.2.6.1. Kalibrasyon Eğrisi.....	38
3.2.6.2. Ekstraksiyon Yöntemi.....	39
3.2.6.3. LC-MS/MS Analiz Şartları.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Oksitetrasiklin.....	43
4.2. Seftiofur.....	45
4.3. Enrofloksasin.....	46
4.4. Tilosin.....	48
4.5. Tilmikosin.....	50
4.6. Florfenikol.....	52
4.7. Penisilin G.....	54
4.8. Amoksisilin.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
5.1. Oksitetrasiklin.....	60
5.2. Seftiofur.....	63
5.3. Enrofloksasin.....	66
5.4. Tilosin.....	71
5.5. Tilmikosin.....	75
5.6. Florfenikol.....	79
5.7. Penisilin G.....	83
5.8. Amoksisilin.....	86
6. KAYNAKLAR.....	91
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	105
8. TEŞEKKÜR.....	107
9. ÖZGEÇMİŞ.....	108

ÖZET

ANTİMİKROBİYAL İLAÇ KALINTILARININ, DANALARIN KESİM ÖNCESİ VE SONRASI BİYOLOJİK ÖRNEKLERİNDE BİOCHIP ARRAY TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ

Veteriner hekimliğinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ilaçlar, bilinçsiz kullanılmaları halinde hayvansal gıdalarda kalıntıya neden olabilmektedir. Gıdalardaki ilaç kalıntıları küresel etkilere sahip, ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Besi hayvanlarında yapılan rutin kalıntı analizleri, çoğunlukla kesim sonrası elde edilen, gıda değeri olan dokular üzerinden yürütülmektedir. Kalıntı varlığının, kesim öncesinde alınan biyolojik örneklerden tespit edilmesi, sürecin yönetilebilir olmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı, terapötik dozlarda antimikrobiyal uygulanmış besi danalarının kesim öncesinde alınan serum, ağız sıvısı ve dışkı gibi biyolojik örneklerinde kalıntı varlığının biochip array tekniği ile hızlı ve pratik bir şekilde tespit edilip edilemediği; yasal arınma süreleri sonunda kesime gönderilen hayvanların karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilen antimikrobiyallerin maksimum kalıntı limitlerini aşıp aşmadığı ve bu kapsamda prospektüste belirtilen yasal arınma sürelerinin pratikle uyumlu olup olmadığının belirlenmesidir.

Çalışmada her bir antimikrobiyal için 4 adet besi danasından oluşan bir çalışma grubu oluşturulmuş ve toplamda 32 adet besi danası ile çalışılmıştır. Veteriner hekimliğinde sıklıkla kullanılan 8 farklı antimikrobiyal ilacın (oksitetrasiklin, seftiofur, enrofloksasin, tilosin, tilmikosin, florfenikol, penisilin G ve amoksisilin) ticari preparatları, prospektüs bilgileri doğrultusunda, deney grubunda bulunan besi danalarına uygulanmıştır. Numune toplama günleri, antimikrobiyallerin yasal arınma sürelerine göre belirlenmiştir. Kesim öncesinde serum, ağız sıvısı ve dışkı; kesim sonrasında ise karaciğer, böbrek ve kas örnekleri alınarak, bir tarama yöntemi olan biochip array tekniği ile analizleri yapılmıştır. Pozitif sonuçların bir kısmı LC-MS/MS yöntemi ile doğrulanmıştır.

Biochip array sonuçlarına göre, serumda oksitetrasiklin, enrofloksasin, tilosin, tilmikosin, florfenikol, penisilin G ve amoksisilin; ağız sıvısında oksitetrasiklin, seftiofur, enrofloksasin, tilosin ve tilmikosin; dışkı örneklerinde ise tilosin ve florfenikolün tespit edilebildiği belirlenmiştir. Yasal arınma süresi sonunda alınan karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde antimikrobiyallerin tespit edilebildiği, tilosin hariç, maksimum kalıntı limitlerini aşmadığı ve prospektüste belirtilen yasal arınma süreleriyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Tilosinin karaciğer ve böbrek örneklerinde tespit edilen konsantrasyonları, LC-MS/MS ile doğrulanmış ve sonuçların maksimum kalıntı limitlerini aştığı belirlenmiştir. Bu kapsamda, tilosinin prospektüste belirtilen yasal arınma sürelerinin yetersiz kalabileceği ve yasal arınma sürelerinin daha kapsamlı çalışmalarla gözden geçirilmesi gerektiği görülmüştür.

Sonuç olarak, antimikrobiyal ilaç kalıntılarının, sığırların kesim öncesi ve sonrası alınan örneklerde biochip array yöntemi ile hızlı ve pratik bir şekilde tespit edilebildiği belirlenmiştir. Kullanılan yöntemin tarama testi olmasından dolayı, kalıntı varlığının sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için elde edilen pozitif sonuçların kromatografik yöntemlerle doğrulanması gerektiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal, kalıntı, biyolojik örnek, dokular, biochip array.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL RESIDUES IN SOME BIOLOGICAL SAMPLES OF BEEF CATTLE BEFORE AND AFTER SLAUGHTER BY BIOCHIP ARRAY TECHNIQUE

Antimicrobial drugs, which are widely used in veterinary medicine, can cause residues in animal-origin foods if they are used unconsciously. Antibiotic residues in food are a serious public health problem with global implications. Routine residue analysis in livestock are carried out mostly on food value tissues obtained after slaughtering. Detection of antibiotic residues in biological samples taken before slaughter will ensure that the presence of residues is manageable. Thus, an environment of trust might be occurred for food safety, public health and exports.

Aim of this study to determined whether the presence of residues could be detected in biological samples such as serum, oral fluid and feces taken before slaughter from beef cattles by biochip array, practically. Beef cattles were treated with therapeutic doses. In addition, aimed to asses whether the antimicrobial drug concentrations detected in the liver, kidney and muscle samples of the animals exceed the maximum residue limits at the end of the withdrawal times. In this way, it will be evaluated the compatibility of the withdrawal periods of antimicrobials with practice.

Commercial preparations of 8 different antimicrobial drugs (oxytetracycline, ceftiofur, enrofloxacin, tylosin, tilmicosin, florfenicol, penicillin G and amoxicillin), which are frequently used in veterinary medicine, were applied to totally 32 beef cattle (8 groups of 4 each) in accordaning to prospectus information. Sample collection days were determined by considering the withdrawal times of the applied antimicrobials. Before slaughter serum, oral fluid, and feces; after the slaughtering liver, kidney, and muscle samples were taken and analyzed with the biochip array technique. Some positive samples were confirmed by LC-MS/MS.

According to the biochip array results, determined that could be detected of oxytetracycline, enrofloxacin, tylosin, tilmicosin, florfenicol, penicillin G and amoxicillin in serum; oxytetracycline, ceftiofur, enrofloxacin, tylosin and tilmicosin in oral fluid; tylosin and florfenicol in feces samples. At the end of the withdrawal period, it was determined that the antimicrobials detected in the liver, kidney and muscle samples did not exceed the maximum residue limit with the exception of tylosin and the withdrawal periods were compatible. Concentrations of tylosin in two liver and one kidney samples determined by biochip array technique were confirmed by LC-MS/MS and it was determined that the results exceeded the maximum residue limits. Withdrawal time of tylosin specified in the prospectus may be insufficient and should be reviewed with more comprehensive studies.

As a result, determined that antimicrobial residues can be detected quickly and practically in the samples taken before and after slaughter by the biochip array based immunoassay method. The biochip array technique used in the study is the screening test, so that it is necessary to confirm the positive results by chromatographic methods in order to evaluate the presence of antimicrobial residues accurately.

Key word: Antimicrobial, residue, biological samples, tissue, biochip array.

1. GİRİŞ

Antimikrobisallerin, veteriner hekimliğinde hayvan hastalıklarının tedavisinde ve özellikle hayvancılık işletmelerinin endüstriyel nitelik kazanmasıyla birlikte verim artırıcı, gelişimi destekleyici ya da profilaktik amaçla yem katkıları olarak kullanımları yaygınlaşmıştır (FEDESA, 2001; Kemper, 2008). Antibiyotiklerin yem katkıları olarak kullanılmasıyla, et üretimine yönelik işletmelerde %3-12 oranında yemden tasarruf sağlandığı bildirilmektedir (Şener, 2006). Bu olumlu etkiler, hayvanların sindirim kanalında bulunan bakterilerin metabolizmalarının baskılanması sonucu bakterilerin daha az besin (amino asit) tüketmelerine ve hayvanlar için zararlı toksik ürünleri (amonyak-üre) daha az üretmelerine dayandırılmaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde, 2000 yılında üretilen 16.200 ton antibiyotiklerin %70'i veteriner hekimlik alanında kullanılmıştır (Kümmerrer, 2003). Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde, 2004 yılında veteriner hekimlikte kullanılan antimikrobisaller, yaklaşık 5 bin tonluk kullanım oranıyla ilk sırada yer almaktadır (Kools, Moltmann ve Knacker, 2008). Bunu hormonlar, metabolizma düzenleyiciler ve antiparaziter ilaçlar takip etmektedir. 2006 yılı verilerine göre Türkiye'de veteriner hekimlikte kullanılan ilaçların büyük çoğunluğunu antibakteriyaller oluşturmaktadır (VİSAD, 2016). Antimikrobiyal etkinliğe sahip β -laktam, tetrasiklin, aminoglikozit, makrolid, sulfonamid, florokinolon, linkozamid, nitrofuran, polimiksin ve kinolon grubu ilaçlar hayvancılık sektöründe tedavi ve koruyucu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (Cha'fer-Perica's, Maquieira ve Puchades, 2010; Deshpande, 2002; Yıbar ve Soyutemiz, 2013). Avrupa ilaç ajansı (EMA) sunduğu raporda, 2013 yılında hayvan sağlığında en çok kullanılan antimikrobisallerin tetrasiklinler (%36,7), penisilinler (%24,5), sulfonamidler (%9,6) ve makrolidler (%7,4) olduğunu bildirmiştir (ESVAC Report, 2015). Bu verilere bakıldığında veteriner hekimliğinde antimikrobiyal ilaç kullanımının küresel boyutlarda olduğu görülmektedir.

Antibiyotiklerin yoğun ve bilinçsiz kullanımı gıdalarda kalıntıya neden olmaktadır. Kalıntı oluşumuna neden olan faktörler arasında, antimikrobiyal tedavi sırasında hastanın değişen fizyolojik veya patolojik durumlarının göz ardı edilmesi,

antibiyotik içeren yem katkı maddelerinin kullanılması ve çevrede (yem, su, toprak) bulunan kalıntılara uzun süreli maruziyeti gösterilebilir. Tüm bu faktörlerin yanı sıra, uygulanan antibiyotiğin yasal arınma süresine dikkat edilmemesi ve etiket dışı ilaç kullanımı gıdalarda kalıntıya neden olan en önemli etkenler olarak kabul edilmektedir (Filazi, 2012).

Etiket dışı ilaç uygulaması, ilaçların veteriner hekim kontrolünde hedef türünü, dozunu, uygulama sıklığını, uygulama yolunu ya da tedavi süresini değiştirerek kullanılmasını ifade eder. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın 24.12.2011 tarih ve 28152 sayılı "Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik" te yer verildiği gibi, hem ülkemizde hem de dünyada kabul gören bir yaklaşımdır (Yarsan ve Pehlivan, 2020). Veteriner hekimlerin, sistemik antibiyotikleri etiket dışı kullanma oranları, sığır ve buzağı yetiştiriciliğinde %30, koyun ve keçi yetiştiriciliğinde ise %20'nin üzerinde olduğu bildirilmiştir (Yarsan ve Pehlivan, 2020). Gıda değeri olan hayvanlarda belirlenen yasal arınma süreleri, prospektüste yer alan kullanım şartları için geçerlidir. Etiket dışı ilaç kullanımı, yasal arınma sürelerinin değişimine neden olabileceğinden, kalıntı oluşumu açısından ciddi risk oluşturmaktadır. Özellikle gıda değeri olan hayvanların tedavisi söz konusu olduğunda, veteriner hekimin sorumlulukları arasında etkin tedavinin yanı sıra gıda güvenliği de yer almalıdır.

Gıdalardaki antibiyotik kalıntılarının halk sağlığını etkileyen ciddi bir sorun olmasından dolayı, besin değeri taşıyan hayvanlara uygulanan antimikrobiyallerin çok daha dikkatli bir şekilde uygulanması ve takip edilmesi gerekmektedir. Aksi halde halk sağlığını tehdit eden pek çok istenmeyen etki ortaya çıkmaktadır. Bunlardan ilki ve en önemlisi, dirençli bakteri suşlarının gelişmesidir. Tüm dünyada hızla yayılan antimikrobiyal direnç, tıp ve veteriner otoriteleri tarafından halk sağlığını tehdit eden küresel bir sorun olarak kabul edilmektedir (Yarsan, 2018). Dünya sağlık örgütü (WHO), hatalı uygulanan antibiyotiklerin, bakterilerde direnç oluşumuna neden olduğunu ve bu nedenle beşeri hekimlikte kullanılan antibiyotiklerin giderek etkinliğini kaybettiğini bildirmiştir (WHO, 2011). Antibiyotik kalıntılarının duyarlı bireylerde alerjik reaksiyonları tetikleyebildiği ve bazı antimikrobiyallerin toksik etkiler oluşturabildiği bildirilmiştir (Singh, Shukla, Tandia, Kumar ve Paliwal, 2014). Gıdalarda bulunan yüksek antibiyotik

konsantrasyonları gastrointestinal mikroflorayı bozarak metabolik faaliyetleri aksatabilir, duyarlı bakterileri öldürerek dirençli bakterilerin çoğalmasına neden olabilir. Antimikrobiyal kalıntılar halk sağlığı üzerine olan etkilerinin dışında peynir, yoğurt, sucuk, sosis gibi fermente gıda üretiminde starter kültür ve enzim aktivitesini inhibe ederek ekonomik kayıplara neden olabilir.

Gıda değeri olan hayvanlarda bilinçsiz ilaç kullanımı ve kalıntıların neden olduğu istenmeyen etkiler, tüketicilerin gıda güvenliğine olan kaygılarını artırmaktadır (Demircioğlu, 2004). Bekar ve diğerleri (2013), Muğla ilinde yaşayan tüketicilerin gıda güvenliğine olan yaklaşımlarını değerlendirmek amacıyla 400 kişi ile anket çalışması yapmıştır. Anket verilerine göre, tüketicilerin %69'unun antibiyotik, %77'sinin de hormon kalıntısı içerdiğini düşündükleri gıdaların tüketimini azalttığı belirlenmiştir. Tüketiciler ve veteriner hekimler ile gerçekleştirilen anket çalışmalarında elde edilen veriler, toplum tarafında yaşanan kaygı durumunu gözler önüne sermektedir (Özen, Yüksel ve Doğan, 2010; Demir ve Aydın, 2018).

Hayvansal gıdalarda bulunabilecek kalıntı riskini belirlemek adına, tüketicinin kullanımına sunulmuş gıda örneklerinde kalıntı varlığını araştıran çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Ankara Et ve Balık Kurumundan alınan 50 adet sığır eti örneğinde kalıntı analizi yapılmış ve 50 numunenin 7'sinde (%14) böbrek dokularında oksitetrasiklin kalıntısı tespit edilmiştir (Yüksek, 2000). Bursa'da 2005 ve 2006 yılları arasında, market ve kasaplar ile civardaki askeri birliklerden alınmış sığır etlerinde streptomisin ve sulfametazin (sulfadimidin) kalıntıları araştırılmıştır. Çalışma sonucuna göre, 60 adet et numunesinin dördünde streptomisin, birinde sulfametazin tespit edilmiştir. Ancak sonuçların tüketici sağlığı için risk oluşturacak düzeylerde olmadığı belirlenmiştir (Oruç, Cengiz, Bağdaş ve Uzunoğlu, 2007). Bursa'da, 2017 yılında market ve kasaplardan alınan 36 adet dana eti, 9 adet piliç eti örneğinin anabolizan ve antimikrobiyal kalıntıları biochip array-based immunassay tekniği ile analiz edilmiştir. Çalışmada, numunelerin hiçbirinde anabolik madde kalıntısına rastlanmazken, 36 dana eti numunesinin 10 tanesinde; 9 piliç eti numunesinin de 2 tanesinde antimikrobiyal kalıntıya rastlanmıştır. Ancak tespit edilen miktarların kalıntı limitini aşmadığı belirlenmiştir (Kılıç, 2017). Şanlıurfa'da

kasaplardan toplanan sığır ve koyun eti örneklerinde yapılan bir çalışmada, analiz edilen 20 sığır etinin 10'unda, 20 koyun etinin 8'inde antibiyotik kalıntısı tespit edilmiştir (Aydemir, Altun ve Durmaz, 2019). Yukarıda bildirilen çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde, gıdalarda ilaç kalıntılarında rastlanabilmektedir.

Uluslararası otoriteler tarafından yapılan yasal düzenlemelerle, gıdalarda bulunabilecek farmakolojik aktif maddelere belirli kısıtlamalar getirilmiş ve gıdalarda bulunabilecek miktarları maksimum kalıntı limitleri (MRL) ile sınırlandırılmıştır (EC, 2010; FAO/WHO, 2018). Ülkemizde, MRL değerleri, AB Mevzuatı ile uyumlu olarak "Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği" ile belirlenmiştir (TGK, 2017).

Ülkemizde hayvansal gıdalardaki kalıntı kontrolü Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından, 17.12.2011 tarihli 28145 sayılı resmi gazetede yayınlanan "Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesine için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik" esaslarına göre AB'nin 96/23/EC direktifi ile uyumlu olarak yürütülmektedir (EC, 1996; TGK, 2011a).

Tüketici sağlığının korunması amacıyla, düzenli olarak gıdalarda kontrolleri yapılarak kalıntı varlığı açısından yasal düzenlemelere uygun olup olmadığı belirlenmelidir. Bu kapsamda tarama ve doğrulama testleri kullanılmaktadır. Tarama testleri pratik, hızlı ve ucuz olmalarına rağmen, spesifikliği ve duyarlılığı düşük olan yöntemlerdir (Özdemir ve Traş, 2018). Mikrobiyolojik yöntemler (mikrobiyal inhibisyon testleri), immunokimyasal yöntemler (ELISA, Biochip Array Based Immunoassay gibi) ve biyosensörler en sık kullanılan tarama yöntemleridir. Çalışmada kullanılan biochip array based immunoassay yöntemi bir tarama testi olup, çalışma prensibi kompetitif immunokimyasal reaksiyonlara dayanır (Randox Kullanım Kitapçığı, 2016).

Çalışmada, biochip array based immunoassay yöntemlerinden olan, Antimikrobiyal Array II (AM II) ve Beta Laktam Array (BLACT) ile çalışılmıştır. AM II yöntemi ile 6 farklı antimikrobiyal grup eş zamanlı analiz edilebilirken, BLACT yöntemi ile 3 farklı antimikrobiyal aynı anda kantitatif olarak tespit

edilebilir. Biochip array yöntemi, antimikrobiyal grup bazında ölçüm yapmaktadır. Uygulama kitapçığında, ölçüm yaptığı antimikrobiallere ait bireysel duyarlılık oranları belirtilmiştir. Duyarlılık oranlarının uygulanmasıyla, bireysel antimikrobiyal konsantrasyonları kabaca belirlenebilmektedir. Çalışma prensibi ve tarama testi olması göz önünde bulundurularak, elde edilen şüpheli sonuçların kromatografik yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir.

Kromatografik yöntemler, spesifikliği ve duyarlılığı ile kalıntı analizlerinde hem analiz hem de doğrulama amacıyla kullanılırlar (Yıbar, 2011). Yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC), likit kromatografi-kütle-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC/MS) kalıntı analizlerinde en sık kullanılan kromatografik yöntemlerdir. AB 96/23/EC direktifinde, gıdalarda bulunabilecek veteriner ilaç kalıntılarının yasal kontrolünde LC-MS/MS ve GC-MS yöntemlerinin kullanılması kararlaştırılmıştır (EC, 1996).

Gıda değeri olan hayvanlarda antibiyotik kullanımı sınırlandırılmış ve kesim öncesi yasal arınma süresi belirlenmiş olmasına rağmen, saha şartlarında ilaç uygulanan hayvanlar bu süreler yeterince dikkat edilmeden doğrudan kesime gönderilebilmektedir. Bu kapsamda, ilaç kalıntılarının kontrolü amacıyla kesimhanelerde ve et satış yerlerinde rutin ve yeterli bir yasal bir denetim mekanizması bulunmamaktadır. İlgili saha çalışmaları ve mevzuatta tanımlanan hedef numuneler, hayvansal gıdalardaki kalıntı kontrolünün kesim sonrası alınan ve gıda değeri olan dokular üzerinden yürütüldüğünü göstermektedir. Kesim sonrasında maksimum kalıntı limitlerini aştığı tespit edilen gıdalar için yapılabilecek tek şey söz konusu gıdanın imhasıdır. Ekonomik ve sahada genellikle uygulanabilir olmamasından dolayı, bu süreç ya halk sağlığının riske girmesiyle ya da yetiştirici için ekonomik kayıpla sonlanmaktadır. Bu nedenle antimikrobiallerin kesim öncesinde tespit edilebileceği pratik bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Kalıntı varlığının kesim öncesi alınan biyolojik örneklerle tespit edilmesi ve gerekli görülmesi durumunda kesimin ertelenmesi kalıntı sürecinin yönetilebilmesini sağlayacaktır. Böylece hem halk sağlığının, hem yetiştiricinin, hem de ülke ekonomisinin korunmasına katkıda bulunacaktır.

Bu çalışmada tedavi dozlarında uygulanan antimikrobiyallerin, danalarının kesim öncesi serum, ağız sıvısı ve dışkı; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas rnekleinde tespit edilip edilemediği, tespit edebilme durumunda ise hangi rnekleinde sağlıklı sonuçlar alındığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca yasal arınma süresi sonunda alınan karaciğer, böbrek ve kas rnekleindeki kalıntı düzeyleri incelenerek, prospektüste belirtilen yasal arınma süreleri ile uyumu değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Veteriner Hekimliğinde Antimikrobiyal İlaç Kullanımı

Antimikrobiyaller, çeşitli bakteri, mantar ve aktinomisetler gibi canlı mikroorganizmalar tarafından üretilen veya kimyasal yöntemlerle sentezlenen, mikroorganizmaların gelişmesini durduran ya da öldüren bileşiklerdir (Şener, 1990; Kayaalp, 1991; Şanlı ve Kaya, 1994).

Antimikrobiyaller, üretiliş amacına uygun olarak, hastalıkların tedavisi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Böylece, hastalıkların neden olacağı önemli kayıplar ciddi boyutlara ulaşmadan engellenebilmektedir. Bu nedenle de hayvanların sağlığı ve refahının sürdürülebilirliği açısından değerli araçlardır. Bunun yanı sıra, dünya çapında artan gıda ihtiyacını karşılamak adına oluşan maksimum verim ve minimum kayıp anlayışı, antimikrobiyaller için yeni bir kullanım alanı yaratmıştır. Bu kapsamda profilaktik amaçla ya da gelişimlerine katkı sağlamak adına yem katkısı olarak uzun yıllar kullanılmıştır (Şener ve Yıldırım, 2002). ABD’de kullanılan toplam antibiyotiklerin %84’ü veteriner hekimlikte, bunun da %78,5’i profilaktik ve büyüme hızlandırıcı olarak, %5,7’si de tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Oruç ve diğerleri, 2007). 1997 yılında, Avrupa Birliğinde hayvancılık alanında kullanılan antimikrobiyallerin %31’inin gelişimi artırmak amacıyla yem katkısı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Ungemach, 2000). Antimikrobiyallerin yem katkı maddesi olarak kullanımı, bakteriyel direnç gelişimi ve kalıntı konusunda halk sağlığı açısından ciddi endişe yaratmıştır. Bu kapsamda, 2006 yılı itibariyle AB’nde ve Ülkemizde antibiyotik büyüme faktörlerinin çiftlik hayvanlarında yem katkısı olarak kullanımı tümüyle yasaklanmıştır (EC, 2003; TGK, 2006).

Antibiyotikler tüm dünyada en çok kullanılan ilaçlar arasında ilk sıralarda yer almaktadır (Topal, Şenel, Topal ve Öbek, 2015). Türkiye’de 2006 verilerine göre, veteriner hekimliğinde ilaç grupları bakımından toplam tüketimin %77’sini antibakteriyaller oluşturmaktadır (VİSAD, 2006). Hayvan sağlığında yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal gruplar beta-laktamlar, makrolidler, aminoglikozidler, tetrasiklinler, kinolonlar, amfenikoller ve polimiksinler’dir (Despande, 2002).

2.2. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Gruplar

Bu bölümde, çalışmada kullanılan antimikrobiyallerin grup ve bireysel özelliklerinden bahsedilecektir.

2.2.1. Beta-Laktamlar

Beta-laktam grubu antibiyotikler, günümüzde en yaygın kullanılan ve beta-laktam halkası olarak adlandırılan ortak molekülleri ile diğerlerinden ayrılan önemli bir gruptur. Geliştirilen beta-laktam grubu antibiyotiklerin tümü, ortak molekül olan beta-laktam halkasına bağlı aminoasitler üzerinde yapılan modifikasyonlar sonucunda şekillendirilmiştir (Şanlı ve Kaya, 1991).

Beta-laktamlar, alt grup ve etken maddeye bağlı olarak Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı etkilidir. Temel olarak hücre duvar sentezini bozarak ve bakterilerin otolizin ve murein hidrolaz gibi otolitik enzimlerini aktive ederek bakterisit etki gösterirler. Bakterinin, hücre duvarı yapısında bulunan peptidoglikan sentezinin transpeptidasyon aşamasında görevli olan *transpeptidaz* ve *karboksipeptidaz* enzimlerinin inhibisyonuna, hücre duvar bütünlüğünün bozulmasına, ozmotik direnç kaybına ve ölümüne neden olmaktadır (Sarı, 2005; Ayaz, 2008).

Beta-laktam grubu antibiyotikler kimyasal yapılarına göre; penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar olmak üzere dört alt gruba ayrılmışlardır. Çalışmada kullanılan beta-laktam grubu antimikrobiyaller, penisilinler ve sefalosporinlerdir.

2.2.1.1. Penisilinler

Tüm penisilinlerde ortak yapı 6-aminopenisilanik asittir. Bu yapı bir tiazolidin halkası ve bu halkaya bağlı dörtlü bir beta-laktam halkasından oluşur. Günümüze kadar pek çok penisilin türevi geliştirilmiştir. Bunların bazıları kültür ortamına ön maddelerin katılmasıyla (biyosentetik), bazıları da 6-APA'ye bazı grupların bağlanmasıyla yarı-sentetik olarak elde edilmiştir (Şanlı ve Kaya, 1991).

Penisilinler; Doğal Penisilinler (Penisilin G, Penisilin V), Aminopenisilinler (Ampisilin, Amoksisilin), Karboksipenisilinler (Karbenisilin, Tikarsilin),

Üreidopenisilinler (Piperasilin, Mezlosilin), Penisilinaza Dirençli Penisilinler (Metisilin, Oksasilin), Beta-laktamaz İnhibitörleri (Klavulanik Asit, Sulbaktam) olmak üzere 6 grupta sınıflandırılırlar (Aydemir, 2004; Balcı, 2007).

Penisilin G, *Penicillium chrysogenum* mantarlarından elde edilir (Şanlı ve Kaya, 1991). Penisilin üretecek olan mantarın türüne ve kültür ortamlarına eklenen ön maddenin çeşidine göre üretilen biyosentetik penisilinler; penisilin F, -G, -X, -O, -V ve -K diye isimlendirilir. Doğal penisilinlerden yalnızca Penisilin G tedavi bakımından önem taşır (Şanlı ve Kaya, 1991). Gram (+) bakterilere karşı etkindir. Mide asidine dayanıksız olduklarından parenteral yolla uygulanırlar (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Penisilin G'nin vücutta kalış süresini artırmak için çeşitli organik tuzlar ile hazırlanmış ticari formları bulunmaktadır.

Amoksisilin, yarı sentetik olarak üretilir (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterilere karşı etkili olduğundan, penisilin G'ye göre etki spektrumu daha geniştir (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Mide asidine karşı dayanıklıdır. Beta-laktamaz enzimi tarafından kolaylıkla inaktive edilir. Bu nedenle çoğunlukla, beta-laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır.

2.2.1.2. Sefalosporinler

Sefalosporinler ilk olarak 1945 yılında *Cephalosporicum acremonium* kültürlerinden izole edilmiş olup, penisilinlere moleküler yapı ve biyolojik etkinlik açısından benzerdir (Abraham ve Loder, 1972).

Yapısal olarak, beta-laktamazlara karşı direnci artıran beta-laktam halkasına bağlı 6 üyeli dihidrotyazin halkasından oluşur (Şener, 2006). Kimyasal modifikasyonlarla moleküler özellikleri değiştirilerek, birbirinden farklı moleküler yapı ve etki spektrumlarına sahip sefalosporin alt grupları geliştirilmiştir (Öncül, 2002). Bu gruplar, antibakteriyel tedavide sıklıkla tercih edilmektedir.

Sefalosporinler moleküler yapıları ve etki spektrumlarına göre dört ana grupta toplanır. Bunlar birinci kuşak sefalosporinler (sefazolin, sefalotin, sefaleksim, sefadroksil), ikinci kuşak sefalosporinler (sefuroksim, sefonisid, sefaklor, sefoksitin),

üçüncü kuşak sefalosporinler (seftiofur, sefotaksim, sefoperazon, seftazidim) ve dördüncü kuşak sefalosporinler (sefepim, sefkuinom, sefpirom)' dir. Birinci kuşaktan dördüncü kuşağa doğru Gram (+) etkinlik azalırken, Gram (-) etkinlik artar (Saran ve Karahan, 2010). Çalışmada, 3. kuşak sefalosporin olan seftiofur kullanılmıştır.

Seftiofur, hem Gram (+), hem de Gram (-) bakterilere karşı etkinlik gösterirken, aynı zamanda beta-laktamaz enzimine karşı da dayanıklıdır (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Mide asitinde inaktive olur, bu nedenle parenteral yolla kullanımı önerilmektedir (Şanlı ve Kaya, 1991; Öncül, 2002).

2.2.2. Makrolidler

Makrolidler ilk olarak, 1952 yılında topraktan izole edilen *Streptomyces erythreus* suşundan elde edilmiştir (Sivapalasingam ve Steigbigel, 2010).

Makrosiklik lakton halkasına, glikozit bağlarıyla şekerlerin bağlanmasıyla oluşan bir yapı gösterirler. Lakton halkasındaki karbon atomlarının sayısına göre isimlendirilir.

Makrolidler, birçok Gram (+) bakterinin yanı sıra, bazı Gram (-) bakterilere, mikoplazma, klamidy, treponema ve riketsiyalara karşı da etkinlik gösteren geniş sepektrumlu antimikrobiallardır (Joseph, Moellering ve Moellering, 2003). Bakteri ribozomunun 50S alt ünitesindeki 23S rRNA'nın V bölgesine geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Böylece RNA bağımlı protein sentezini engelleyerek bakteriyostatik etki gösterirler (Zuckerman, Qamar ve Bono, 2009).

Eritromisin, klaritromisin, azitromisin, tilosin, tilmikosin, spiramisin, tulatromisin, roksitromisin ve oleandomisin makrolid grubu antimikrobialların başlıca üyesidir. İlk olarak izole edilen ve asidik ortamda etki gücü zayıflayan eritromisinin, bu dezavantajını gidermek amacıyla aside dayanıklı, yarı ömrü uzun, yüksek etkinlik, düşük yan etkili yarı sentetik yeni makrolidler geliştirilmiştir (Prescott, 2000; Ozansoy, 2013; Kaya, 2002).

Tilosin, *Streptomyces fradia* suşu tarafından üretilen, 4'lü tilosin türevinin (tilosin-A, tilosin B, tilosin C ve tilosin D) karışımından oluşur (JECFA, 2009).

Gram (+) bakterilere ve mikoplazmalara karşı etkilidir (EMEA, 1997a). Geniş etki spektrumu nedeniyle, hastalıkları önlemek için, uzun yıllar yem katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Avrupa Birliği kararı ile yem katkı maddesi olarak kullanımları yasaklanmıştır (EC, 1998).

Tilmikosin, tilosin B'nin (desmikozin) kimyasal modifikasyonları ile yarı sentetik olarak üretilmiştir (Barragry, 1994; EMEA, 1997b). Tilosin ile benzer antimikrobiyal spektruma sahip olmakla birlikte, *Pasteurella multocida* ve *Pasteurella haemolytica*'ya karşı da etkilidir (EMEA, 1997b). Damar içi yolla uygulandığında kardiyotoksik etki gösterebilmektedir (Yan ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, deri altı yolla uygulanmaktadır. Tüm ticari preparatlar için uygulama dozu ve uygulama yolu standarttır (10 mg/kg, deri altı-kas içi). Süt ineklerinde uzun süren yasal arınma süresi ve kalıntı riski nedeniyle kullanımları yasaklanmıştır (Avcı ve Elmas, 2014).

2.2.3. Tetrasiklinler

Tetrasiklinlerin ilk üyesi, 1948 yılında *Streptomyces aureofaciens* mantarından izole edilmiştir (Taşova, 2010). Yapısında, 4 halkalı hidrosinaftasen çekirdeği ve buna bağlı karboksamid grubu içerir (Budavari, 1996).

Tetrasiklinlerin tümü, Gram (-) ve Gram (+) bakterilerin yanı sıra klamidy, riketsia ve protozoalara karşı da etki gösteren geniş spektrumlu antimikrobiklerdir (Landoni ve Errecalde, 1992). 30S'lik ribozomal alt üniteye bağlanır ve bakterinin protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etkinlik sağlar (Yılmaz, 2013).

Tetrasiklinler, temel olarak 2 grupta toplanır. Bunlar, mantarlardan izole edilen doğal tetrasiklinler (klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve demetilkortetrasiklin) ve hidrosinaftasen halkasına yan grupların bağlanmasıyla oluşan yarı sentetik tetrasiklinlerdir (tetrasiklin, doksisiklin, metasiklin, minosiklin) (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Tigesiklinin 2005 yılında kullanıma girmesiyle, tetrasiklinlerin yeni bir alt grubu olarak glisilsiklinler tanımlanmıştır (Taşova, 2010).

Oksitetrasiklin, 1949 yılında *Streptomyces rimosus* kültürlerinden elde edilmiştir (Kater, 2006). Geniş etki spektrumunun yanı sıra, antiinflamatuar etkiye de

sahiptir (Taşova, 2010). Bu özelliklerinden dolayı, hastalıkların önlenmesinde ve büyüme teşvik etmek amacıyla yem katkıları olarak yıllarca kullanılmıştır (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Oksitetrasiklinin yem katkıları olarak kullanımı Avrupa Birliği tarafından 1971 yılında yasaklanırken, Türkiye de, antibiyotik içeren yem katkı maddelerinin kullanımı 2006 yılına kadar devam etmiştir (Tuncer, 2007).

2.2.4. Kinolonlar

Nalidiksik asit, 1962 yılında sentetik olarak oluşturulmuş, kinolon grubu ilk antimikrobiyaldir (Oliphant ve Green, 2002). Kimyasal yapısında gerçekleştirilen modifikasyonlarla ikinci, üçüncü ve dördüncü nesil kinolonlar geliştirilmiştir.

Kinolonlar bakterinin DNA giraz ve tip IV topoizomeraz enzimlerini inhibe ederek, bakterisid etki gösterir (Oliphant ve Green, 2002). Gram (-) bakteriler üzerinde güçlü etkinlik göstermeleriyle karakterizedir. Kinolon çekirdeğine, piperazin grubunun eklenmesi ile Gram (-) etkinlik artarken, flor grubunun eklenmesiyle Gram (+) etkinlik artar (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Geliştirilen yeni nesil kinolonlar, genişletilmiş Gram (-) etkinliğin yanı sıra, Gram (+) bakterilere ve anaerobik mikroorganizmalara karşı da etkilidir (Yılmaz, 2017).

Kinolonlar biyoyararlanım ve etki özelliklerine göre farklı kuşaklara ayrılır. Birinci kuşakta nalidiksik asit, oksolinik asit ve sinoksasin; ikinci kuşakta florokinolonlar olarak da adlandırılan, siprofloksasin, enrofloksasin, marbofloksasin, danofloksasin ve norfloksasin; üçüncü kuşakta orbifloksasin, levofloksasin, sparfloksasin ve grepafloksasin; dördüncü kuşakta ise travofloksasin, gatifloksasin, moksifloksasin, gemifloksasin ve sitafloksasin yer alır (Cengiz, 2010).

Enrofloksasin Gram (-) ve Gram (+) bakterilere, eski kuşak kinolonlara dirençli olan *Pseudomonas* spp.'lere ve hücre içi mikroorganizmalara (riketsiya, klamidya ve mikoplazma) karşı yüksek antimikrobiyal etkiye sahiptir (Vancutsem, Babish ve Schwark, 1990; Mitchell, 2006). Geniş antimikrobiyal etkinliği nedeniyle kanatlılarda, sucul canlılarda ve çiftlik hayvanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kaya, Yarsan, Baydan, Bilgili ve Şeker, 1996; Özdemir, 2010; Kabadayı, 2014).

2.2.5. Amfenikoller

Amfenikollerin ilk üyesi olan kloramfenikol, 1949 yılında *Streptomyces venezuelae* mantarından izole edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2014).

Amfenikollar, geniş etki spektrumuna sahiptir. Gram (-) ve Gram (+) bakterilerin yanı sıra, spiroketlere ve riketsiyalara karşı da etkilidir (Kumar, 2017). Bakterilerin 50S ve 70S ribozomal alt ünitesine reverzible olarak bağlanarak, protein sentezini inhibe eder ve bakteriyostatik etki gösterir (Kumar, 2017).

Amfenikol grubunda bulunan antimikrobikler kloramfenikol, tiamfenikol ve florfenikoldür. Tiamfenikol ve florfenikol, kloramfenikolün bir türevidir (Belda, Campillo, Manzanares, Córdoba ve Viñas, 2020). Kloramfenikolün yapısında bulunan p-nitro grup, aplastik anemiye neden olur (Dowling, 2013). Bu nedenle kloramfenikolün çiftlik hayvanlarında kullanımı yasaklanmıştır (EMA, 1994). Tiamfenikol ve florfenikolün yapısında p-nitro grubu bulunmaz (Birdane, Birdane, Özdemir, Kabu ve Yavuz, 2015; EMA, 1996). Çalışmada, veteriner hekimlikte yaygın olarak uygulanan florfenikol kullanılmıştır.

Florfenikol, kloramfenikolün yapısal analogudur. Kimyasal formu sayesinde, kloramfenikolde görülen yan etkilere neden olmaz ve daha güçlü antimikrobiyal etkinlik sağlar (Birdane ve diğerleri, 2015). Bakterilerin özellikle 70 S ribozomal alt ünitesine bağlanarak peptidil transferaz enzimini inhibe eder ve böylece bakteriyostatik etki gösterir (EMA, 1996) Antimikrobiyal etki spektrumunun benzerliği ve kloramfenikolün gösterdiği zararlı etkileri göstermemesi ve kloramfenikolün çiftlik hayvanlarında yasaklanması nedeniyle, florfenikol kullanımı ön plana çıkmıştır (Yıldırım, 1993).

2.3. Hayvansal Gıdalarda Kalıntı Oluşumuna Neden Olan Faktörler

Modern hayvancılık uygulamalarında, veteriner ilaçlarının kullanımı güvenli gıda üretimi için son derece önemlidir.

Tedavi, profilaksi ya da gelişimi artırıcı amaçla gıda değeri olan hayvanlara uygulanan ilaçlar, kalıntı olarak karşımıza çıkabilmektedir. Kalıntı, hayvanlara

doğrudan uygulanan ya da çevresel faktörler dolayısıyla (yem, su, toprak, gibi) maruz kaldıkları ilaçların veya metabolitlerinin çeşitli nedenlerle hayvansal gıdalarda birikmesidir.

Antimikrobiyal kullanımının yaygınlaşması ve ilaçların kullanım şartlarına uyulmaması, kalıntı riskini gündeme getirmektedir. Hayvansal gıdalarda kalıntı oluşumunun önlenmesi amacıyla, gıda değeri olan hayvanlarda kullanılan tüm ticari preparatlar için yasal arınma süreleri tanımlanmıştır. Yasal arınma süresi, kullanılan veteriner tıbbi ürünün, hayvanlara en son uygulandığı zamanla, bu hayvanlardan gıda elde edilmesi arasında geçmesi gereken süreyi ifade eder (TGK, 2011b).

Bütün otoritelerce kabul edilmiş, kalıntı oluşumunun en önemli nedeni, ilaç için belirlenmiş olan yasal arınma süresine uyulmamasıdır (Filazi, 2012). Yasal arınma süresi, sağlıklı hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla belirlenmektedir. Vücutta fizyolojik parametrelerin ve organ fonksiyonlarının bozulması, ilacın vücuttaki farmakokinetiğini değiştireceğinden bu süreler uzayabilir. İlacın metabolizma ve eliminasyonunda görevli olan organ yetmezlikleri, plazma proteinlerinin artması/azalmasına neden olan patolojik durumlar (gebelik, siroz vb) ve vücut ısısının yükselmesi gibi organizmaya bağlı faktörler ilaçların vücutta kalış süresini değiştirebilir (Filazi, 2012). Örneğin, böbrek yetmezliğinde penisilin ve sefalosporinler gibi başlıca idrar ile atılan antimikrobiyallerin; karaciğer yetmezliğinde ise makrolitler, tetrasiklinler, florokinolonlar gibi karaciğerde metabolize olan antimikrobiyallerin atılım süresi uzayabilir (Şanlı, Filazi ve Kum, 1997; İnce ve Filazi, 2007).

Hastalık durumu dışında, hayvanın türü, yaşı ve cinsiyeti gibi tamamen fizyolojik özelliklerine göre de ilaçların atılım özellikleri değişebilir. Hayvanların karaciğer ve böbrek fonksiyonları türe, yaşa ve cinsiyete göre farklılık gösterir. Bu farklılık, ilaçların vücuttaki proteinlere bağlanma derecesinin, metabolizmasının ve atılımının da farklı olmasına ve ilaç yarı ömrünün değişmesine neden olabilmektedir (Kaya ve Ünsal, 2000). Örneğin, çok genç ya da çok yaşlı hayvanların karaciğer ve böbrek kapasitesi düşük olduğundan, bu hayvanlar daha yüksek kalıntı riski taşımaktadır (Botsoglou ve Fletouris, 2001; Mengozzi ve diğerleri, 2002).

Kalıntı oluşumunda ilacın uygulandığı canlıya bağlı faktörler dışında ilaca ve/veya insan etkinliğine bağlı faktörler de vardır. Tüm ticari preparatların prospektüsünde, ilacın uygulanacağı hedef tür, uygulama dozu, uygulama yolu ve hazırlanış şekli yer alır. İlaç piyasaya çıkmadan önce alınan tüm güvenlik onayları ve belirlenen yasal arınma süreleri prospektüste tanımlanmış kullanım formları için geçerlidir. Prospektüste yer alan bilgiler dışında ilaç uygulanması, gıdalarda kalıntıya neden olabileceği gibi tedavi edilen hayvanlarda da istenmeyen durumlara yol açabilir (Kaya, Yavuz, Akar, Liman ve Filazi, 1992). Prospektüste belirtilen hazırlanış oranlarına uyulmaması, daha yüksek konsantrasyonda ilaca maruz kalınmasına ve kalıntı riskine neden olur (Filazi, 2012). Kas içi uygulanması gereken bir ilaç, deri altı yolla uygulandığında daha yavaş emilim göstereceğinden, vücutta kalış süresinin uzayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca ilacın, prospektüste tanımlanan uygulama yolu dışında kullanılması, kalıntı riskinin yanı sıra tedavi edilen hayvanda ciddi sorunlara da neden olabilir. Örneğin penisilin G'nin sodyum ve potasyum tuzları suda çözünür olduğundan damar içi yolla kullanıma uygundur. Ancak yine aynı penisilin G'nin prokain ve benzatin içeren formları suda çözünmediğinden, yalnızca kas içi yolla uygulanmaları gerekmektedir (Papich, 2016).

Tarım ve Orman Bakanlığı 24.12.2011 tarih ve 28152 sayılı Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmeliğinde, etiket dışı ilaç kullanımını veteriner hekimlerin sorumluluğuna bırakmıştır (TGK, 2011b). Bu kapsamda, veteriner hekim alternatif ticari ürün bulunmaması halinde, kullanılacak ilacın dozaj rejiminde değişiklik yaparak etiket dışı ilaç uygulayabilir. Fransa'da, sığırlarda etiket dışı antibiyotik kullanımının değerlendirilmesi için yapılan bir ankette; yazılan 3.048 reçetenin 404 tanesinde önerilen dozdan daha yüksek; 122 tanesinde daha düşük dozda antibiyotik uygulandığı belirlenmiştir. Aynı çalışma, 3.010 reçeteden 256'sının önerilenden daha sık, 85'inin önerilenden daha seyrek aralıklarla kullanıldığını göstermiştir (Cazeau ve diğerleri, 2009).

Geçmişte yem katkısı olarak kullanılan antimikrobiyallerin, subterapotik dozlarda uzun süreli vücuda alınması kronik maruziyete ve kalıntıya neden olmuştur (Okerman, Van Hoof ve Debeuckelaere, 1998). Ancak 2006 yılında AB ülkelerinde

ve Türkiye’de, antibiyotiklerin çiftlik hayvanlarında büyümei teşvik edici amaçla yem katkısı olarak kullanımı tümüyle yasaklanmıştır (EC, 2003; TGK, 2006).

Bulduğumuz ekosistemde çevre, hayvan ve insan bir bütün olarak sürekli etkileşim halindedir. Çevrede bulunan kalıntılar hayvanlara, hayvanlarda bulunan kalıntılar, hem besin zinciri yoluyla insanlara, hem de hayvansal atıklarla tekrar çevreye kolaylıkla geçebilmektedir (Şener ve Yıldırım, 2002). Bu nedenle, gıdalardaki kalıntı konusu tek tıp tek sağlık anlayışıyla ele alınmalıdır. Aksi halde, dünya üzerinde ilaç kullanımı devam ettiği sürece, hayvansal gıdalarda ilaç kalıntısının bulunması ve değişik düzeylerde tüketiciye geçmesi kaçınılmazdır.

Hayvansal gıdalardaki kalıntı sorunuyla ilgili görüşlerinin belirlenmesi amacıyla 400 klinisyen veteriner hekim ile anket çalışması yapılmıştır (Özen ve diğerleri, 2010). Çalışma sonucuna göre, katılımcıların %67,3’ü hayvansal gıdalarda kalıntı olduğunu düşünmektedir. Ankete katılan hekimler, kalıntı varlığının en önemli nedeninin, muayenesiz ve reçetesiz ilaç satışına bağlı “kontrolsüz ilaç kullanımı” olduğunu bildirmiştir.

Bu kapsamda, kalıntı varlığının önlenmesinde veteriner hekimlere önemli görevler düşmektedir. Reçetesiz ve muayenesiz ilaç satışının yapılmaması, akılcı ilaç kullanımı, ilaç uygulaması sonrasında yasal arınma süresi bakımından hasta takibinin devam etmesi ve yetiştiricilerin bu konuda bilgilendirilmesi oldukça önemlidir.

2.4. Gıdalardaki İlaç Kalıntılarının Neden Olduğu İstenmeyen Etkiler

Gıdalarda antibiyotik kalıntılarının bulunması istenmeyen etkilere neden olabilir. Bu etkiler başlıca, antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç, alerjik reaksiyonlar, mikroflora dengesizlikleri ve gıda endüstrisinde fermente ürün üretimindeki kayıplardır (Botsoglou ve Fletouris, 2001). 1969'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), süt, et ve yumurtada bulunan kalıntılardan kaynaklanan potansiyel sağlık tehlikesine dikkat çekmiş ve özellikle penisilin başta olmak üzere maksimum kalıntı limitlerini aşan miktarda antibiyotik içeren gıda ürünlerinin insan tüketiminde kullanımını yasaklamıştır (Singh ve diğerleri, 2014).

2.4.1. Antimikrobiyal Direnç Gelişimi

Halk sağlığı ve gıda güvenliği için önemli bir tehdit olarak görülen antimikrobiyal direnç, dünyanın pek çok yerinde beşeri ve veteriner hekimlik alanlarında küresel bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Kalıntı ve direnç ilişkisi iki temel mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan ilki hayvanlarda antibiyotiklere karşı gelişen dirençli bakterilerin doğrudan besin zinciri ile insana bulaşması; diğeri ise oluşan bu dirençli bakterilerin hayvansal atıklar veya biyolojik sıvılarla çevreye yayılmasıdır (Barza, 2002; Swartz, 2002).

Antibiyotikler, terapötik dozda kullanıldığında, uygulanan doz patojenleri ortadan kaldırmak için yeterli kabul edildiğinden, direnç geliştirme riski, kabul edilebilir sınırlar içinde değerlendirilmiştir. Asıl risk, subterapötik dozlarda uzun süreli kullanımla ortaya çıkmaktadır (Singh ve diğerleri, 2014). Büyüme destekleyici veya profilaktik amaçla uygulanan antibiyotikler, uzun bir süre boyunca, terapötik konsantrasyondan düşük miktarlarda vücutta kalır. Bu durum, bakterilerin antibiyotiğe karşı dirençli suşlarının ortaya çıkmasına neden olabilir (Pavlov, Lashsev ve Rusev, 2005). Antibiyotik kalıntılarının, insan vücudunda bulunan duyarlı bakterileri yok ederek, dirençli bakterileri baskın hale getirdiği, böylece hastalık durumunda kullanılan antimikrobiyallerin tedavide başarısız olduğu bildirilmektedir (Duru ve Şahin, 2011).

Çiftlik hayvanlarında enrofloksasin kullanılmasıyla, zoonoz bakterilerin siprofloksasine karşı direnç geliştirebildiği, gelişen dirençli bakterilerin hayvansal besinler aracılığıyla insanlara geçebildiği ve böylece bu bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde siprofloksasin etkinliğinin azalabildiği bildirilmiştir (Hopkins, Davies ve Threfall, 2005; Lee ve diğerleri, 2005).

2.4.2. Alerjik Reaksiyonlar

Antibiyotik kalıntısı içeren gıdaların tüketilmesi, bireysel ilaç duyarlılığı olan bireylerde bir takım reaksiyonlara neden olabilir (Singh ve diğerleri, 2014). Özellikle beta-laktamlar ve sülfonamidler olmak üzere, neomisin, nitrofuranlar, eritromisin, spiramisin, novobiyosin ve tetrasiklinler gibi birçok ilaç hassas kişilerde alerjik

reaksiyonlara neden olabilir. Gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntısının, tek başına alerjik reaksiyonu başlatmadığı ancak, duyarlı kişilerde alerjik yanıtı tetikleyebildiği bildirilmiştir (Botsoglou ve Fletouris, 2001). İlaç duyarlılığının, toplumun yaklaşık %7'sinde görüldüğü tahmin edilmektedir (Singh ve diğerleri, 2014).

İlaç kalıntılarının, insanlarda oluşan alerjik reaksiyonların önemli bir nedeni olduğu düşünülür. Ancak, rapor edilmiş kalıntı kaynaklı alerjik reaksiyon sayısı fazla değildir (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Gıdalardaki ilaç kalıntılarında kaynaklanan, akut toksisite sıklığına ilişkin az sayıda belgelenmiş rapor bulunmaktadır (Katz ve Brady, 2000). Hamann, Tolle ve Hesscheu (1979), penisilin kalıntısı içeren eti tüketen bireyde, anaflaktik reaksiyon geliştiğini bildirmiştir (Singh ve diğerleri, 2014). Ayrıca, penisilin enjekte edildikten 3 gün sonra kesilen domuzun etini yiyen bir kasabın öldüğü rapor edilmiştir (Tschevschner, 1972). Burada, bireysel duyarlılığı olan bireylerde kalıntı kaynaklı ilaç alerjisinin nadir de olsa ortaya çıkabileceği görülmektedir. Alerji riski, rastlanma sıklığı az olmasına karşın ortaya çıkardığı etkilerin büyüklüğü bakımından göz ardı edilemeyecek kadar önemli bir konudur.

2.4.3. Toksik Etkiler

Gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntıları toksik etki gösterme potansiyeline sahiptir. Maruz kalınan kalıntının miktarına ve maruziyet süresine bağlı olarak ortaya çıkan toksik etki değişiklik gösterir. Yüksek konsantrasyonun, kısa bir süre alınmasıyla akut toksik etki görülürken, düşük konsantrasyonların, uzun süreli alınmasıyla oluşan kronik toksik etkiler karsinojenik, mutajenik veya teratojenik nitelikte olabilir (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Gıdalardaki kalıntı konsantrasyonları genellikle, akut toksik etki oluşturacak düzeyde değildir (Black, 1984). Bu nedenle kronik toksik etkiler daha yaygın olarak görülmüştür.

Kloramfenikol, kemik iliği supresyonu yaparak, aplastik anemi ve lösemiye neden olur (Kaya, 2018). Dozdan bağımsız olarak, gıdalardaki düşük konsantrasyonları dahi bu etkiyi oluşturabilir (Polak, Wesseling, Schut, Herxheimer ve Meyler, 1972). Bu nedenle kloramfenikolün gıda değeri olan çiftlik hayvanlarında kullanımı tümüyle yasaklanmıştır (EMEA, 1994).

Çeşitli toksikolojik çalışmalarda nitrofuranların, genotoksik ve kanserojen özellik gösterdiği ve gıda ürünlerinde kalıntılarının oluşmasından dolayı insan sağlığı için risk oluşturabileceği belirtilmiştir (Antunes, Machado ve Peixe, 2006). AB’nde, 1993 yılında furaltadon, nitrofurantoin ve nitrofurazonun hayvansal gıda üretiminde kullanımı yasaklanmıştır (EC, 1993).

Fransa, İtalya, İspanya gibi ülkelerde, 1990’lı yıllarda, klenbuterol uygulanmış sığır karaciğerini tüketen kişilerde toksik etkilere rastlandığı bildirilmiştir (Pulce, 1991; Brambilla ve diğerleri, 2000; Garay, 1997; Martinez, 1990; Salleras, 1995; Sporano ve diğerleri, 1998). Bu örneklerdeki kalıntı türü antibiyotik olmasa da, gıda kaynaklı kalıntı varlığının insan sağlığını etkileyecek düzeyde geçebildiğini göstermesi bakımından önemlidir.

Tavşan ve sıçanlarda, florokinolonların embriyo üzerinde teratojenik özellik gösterdiği ve öldürücü olabildiği bildirilmiştir (Guzman, Garcia, Marin, Willoughby ve Demestre, 2003). Sulfametazinin, erkek sıçanlarda tiroid bezi tümörlerine neden olduğu belirlenmiştir (Poirier ve diğerleri, 1999). AB komisyonu kararıyla (EC, 2010), yumurta üreten hayvanlarda sulfametazinin kullanımı yasaklanmıştır.

2.4.4. İntestinal Mikroflora Üzerine Etkileri

Sindirim kanalı florasında bulunan mikroorganizmalar bir denge içerisinde, fizyolojik görevlerini sürdürürler. Bu yapı, besinlerin ve bazı ilaçların emilimi, patojen mikroorganizmaların kontrol altında tutulması gibi pek çok fizyolojik, biyokimyasal ve immünolojik olaydan sorumludur (Tannock, 1998).

Gıdalarda kalıntı olarak bulunan antimikrobiyaller, bağırsak mikroflorasını ve enzim aktivitesini değiştirebilir (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Florada meydana gelen herhangi bir değişiklik, endojen bileşiklerin metabolizmasını etkileyebilir ve özellikle enterohepatik dolaşıma giren ajanların ve diğer ilaçların etkinliğini değiştirebilir (Gorbach, 1993). Mikrofloradaki duyarlı bakterilerin ölmesine ve dirençli bakterilerin çoğalmasına neden olabilir. Ayrıca, uzun süreli antibiyotik kalıntısı içeren gıda tüketiminin insanlarda süperenfeksiyon gelişme riski taşıdığı bildirilmiştir (Schenck ve Callery, 1998).

2.4.5. Gıda Endüstrisine Etkileri

Antibiyotik kalıntıları sadece halk sağlığı üzerinde değil, aynı zamanda gıda endüstrisinde de sorunlara yol açabilir. Gıda değeri olan dokuların antibiyotik kalıntısı içermesi yoğurt, peynir ve sucuk üretimi başta olmak üzere fermente gıda endüstrisinde, starter kültürlerin üremesini engelleyerek kalite problemlerine neden olur (Van Den ve Stobberingh, 2000; Uğur, Nazlı ve Bostan, 1999).

Penisilinler, tetrasiklinler, aminoglikozitler süte geçebilen ve kalıntıya neden olabilecek antimikrobiyallerdir. Sütte bulunan antibiyotikler, laktik asit fermentasyonunu kısmen ya da tamamen inhibe ederek, pıhtı oluşumunu engeller böylece, tat ve doku problemlerinin ortaya çıkmasına neden olur (Singh ve diğerleri, 2014). Penisilinlerin düşük konsantrasyonlarının 0,05-0,01 (IU/ml) dahi starter kültür aktivitesinin yavaşlamasına neden olabildiği bildirilmiştir (Ardıç ve Durmaz, 2006).

Sucuk üretiminde ise, etlerde bulunan ilaç kalıntıları, nitrat redüktazın etkinliğini inhibe ettiğinden, nitrozomiyogloblin şekillenemez ve sucuğun doğal rengi oluşamaz (Kaya ve Ünsal 2013). Botsoglou ve Fletouris (2001), sosis üretiminde görülen fermentasyon başarısızlığının, ham maddede penisilin ve tetrasiklin gibi antimikrobiyal ilaç kalıntılarının varlığından kaynaklandığını ve bu konsantrasyonların penisilin için 0.9 ve 1.6 IU/g ve tetrasiklin için 4 ve 1.9 g/g olduğunu bildirmiştir.

2.4.6. Ekosistem Üzerindeki Etkileri

Antibiyotik kalıntılarının insan ve hayvan sağlığı yanında çevresel boyutu da vardır. İnsanlara ve hayvanlara uygulanan antimikrobiyaller, %10-90 arasında dışkıyla atılmakta ve bir şekilde toprağa, suya ve yem maddelerine (otlara, sebze, meyve) karışmaktadır (TÜBA, 2017).

İlaçlar kolay uygulanabilmeleri ve uzun süre boyunca etkin kalabilmeleri amacıyla olabildiğince dayanıklı ve sıvı fazda hareketlilikleri yüksek olarak üretilirler. Bu özelliklerinden dolayı, ilaç içindeki aktif maddeler ve metabolitleri, ekosistemde kolaylıkla birikim ve dağılım gösterebilir (Ruhoy ve Daughton, 2008; Duong ve diğerleri, 2008). Antibiyotikler, konvansiyonel aerobik çamur sistemleri

ile arıtılmadığından arıtma tesisi çıkış sularında bulunabilir (Kim ve Aga, 2007; Kümmerer, 2009). Beşeri ve veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan ampisilin ve eritromisin, atık sularda en çok görülen antibakteriyeller olduğu bildirilmiştir (Kümmerer, 2001; Zuccato, Castiglioni ve Fanelli, 2005).

Danimarka'da yapılan bir çalışmada, domuz çiftliğinde sıvı hayvan gübresi kullanılan tarlalarda, tetrasiklin dirençli bakteri prevalansının arttığı rapor edilmiştir (Wegener, 2003; Flamm 2010).

Lemus ve diğerleri (2008), çiftlik hayvanlarının karkaslarında bulunabilecek antibiyotik kalıntılarının, vahşi yaşam popülasyonlarına geçebileceğini öne sürmüştür. Pek çok Cinereous (%57) ve Egyptian (%40) akbalarının plazmasında yüksek konsantrasyonlarda antibiyotik bulunduğu, tüm Cinereous akbalarının karaciğer örneklerinde ise enrofloksasin ve siprofloksasin tespit edildiği bildirilmiştir. Antibiyotiklerin bilinçsiz ve yaygın kullanımı, çevreye saçılımını artırmakta ve kısır bir döngü içerisinde devam ederek ekosistemdeki tüm paydaşların sağlığını tehdit etmektedir.

2.5. Gıdalardaki İlaç Kalıntılarına Toplumsal Yaklaşım

Son dönemlerde, gıdalarda bulunan ilaç kalıntılarının resmi otoritelerce tespit edilerek ifşa edilmesi ve bu konunun medyada sıklıkla yer alması tüketicide ciddi bir farkındalık yaratmıştır. Ancak bu farkındalık bir takım endişeleri de beraberinde getirmiştir. Tüketiciler bugün, özellikle hayvansal kaynaklı gıdaların doğal ve güvenilir olduğuyla ilgili ciddi kaygı taşımaktadır (Kaya ve Ünsal 2013). Demir ve Aydın (2018), hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan hormon ve antibiyotiklerle ilgili haberlerin, kanatlı eti tüketimini etkileyip etkilemediğini tespit etmek amacıyla 475 tüketiciyle anket çalışması yapmıştır. Anket sonuçlarına göre, Kars ilindeki tüketicilerin %70'inin tavuk etini riskli olarak gördükleri ve özellikle gelir seviyesi yüksek olanların tüketimlerini büyük ölçüde azalttığı, gelir durumu düşük olanların ise çıkan haberler nedeniyle yaşanan fiyat düşmesine bağlı olarak tüketimlerini artırdıkları belirlenmiştir. İlaç kalıntılarının neden olduğu bu kaygı durumu, pek çok kişiyi güvenli-pahalı gıda ile güvensiz-ucuz beslenme arasında bir seçim yapmaya zorlamaktadır.

Hayvansal gıdalarla ilgili yaşanan bu güven bunalımını ortadan kaldırmak adına, "herkes için güvenli gıda" anlayışıyla hareket edilerek, hayvansal gıdalarda bulunabilecek kalıntı düzeylerinin sınırlandırılması ve ulusal/uluslararası otoriteler tarafından belirlenen kriterlere göre kontrollerinin yapılması büyük önem arz etmektedir (Yıbar ve Soyutemiz, 2013; Kaya, 2018).

2.6. Antibiyotik Kalıntılara İlişkin Yasal Düzenlemeler ve Kalıntı Kontrolü

Ülkemizde gıda güvenilirliğinin sağlanması, insan ve hayvan sağlığının korunmasına yönelik olarak, Avrupa Komisyonu (EC), Avrupa İlaç Ajansı (EMA), Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gibi gıda güvenliği ve halk sağlığı alanlarında faaliyet gösteren uluslararası kuruluşlarla işbirliği yapılmaktadır (Alper, 2005).

Antibiyotik kalıntılarının istenmeyen etkilerinin önüne geçmek ve tüketici sağlığını korumak adına, veteriner hekimlikte kullanılan ilaçların gıdalarda bulunabilecek miktarlarına düzenleme getirilmiştir. Hayvansal gıdalarda bulunmasına izin verilen farmakolojik aktif madde miktarı, gıda otoriteleri tarafından belirlenen maksimum kalıntı limitleri ile sınırlandırılmıştır (EC, 2010; FAO/WHO, 2018; TGK, 2017).

Maksimum kalıntı limitleri, AB Mevzuatı ile uyumlu olarak Tarım ve Orman Bakanlığı "Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği" ile belirlenmiştir (TGK, 2017). İlgili yönetmelikte, besin değeri olan hayvanlarda kullanımına izin verilen farmakolojik aktif maddelere ait maksimum kalıntı limitleri ile, insan sağlığı açısından tehlikeli olması nedeniyle gıda elde edilen hayvanlarda kullanımı yasaklı olan aktif maddeler yer almaktadır. 2003 yılında AB ile uyumlu olarak hazırlanan tebliğe göre (TGK, 2003), besi hayvanlarında kullanılan hormon ve benzeri maddelerin anabolik amaçla kullanımı, imali, ithalatı ve piyasaya arzına ilişkin yasaklamalar ve sınırlamalar getirilmiştir.

AB ile uyumlu olarak 2006 yılında yayınlanan "Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ" kapsamında antibiyotiklerin gelişimi teşvik edici amaçla, yem katkı maddesi olarak kullanımı yasaklanmıştır (EC, 2003; TGK, 2006).

Türkiye’de 2013 yılında yürürlüğe giren "Hayvan Beslemede Kullanılan Yem Katkı Maddeleri Hakkında Yönetmelik" uyarınca koksidiyosatlar ve histomonostatlar dışında antibiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılması yasaklanmıştır (TGK, 2013). İlgili yönetmelik ve tebliğler ile kullanımı yasaklanan, sınırlandırılan veya şarta bağlanan farmakolojik maddelerin hayvansal gıdalardaki varlığı/ miktarları yasalara uygunluk bakımından düzenli olarak kontrol edilmelidir.

Bu amaçla oluşturulan kalıntı izleme programlarında kalıntısı aranacak maddelerin listesi ve kalıntı aranacak gıda maddeleri AB’nin 96/23/EC direktifinde ifade edilmiştir (EC, 1996). Bu direktifle uyumlu olarak, Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 17.12.2011 tarihli 28145 sayılı resmi gazetede yayınlanan "Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesine İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik" esaslarına göre ulusal kalıntı izleme planı uygulanmaktadır (TGK, 2011a). Bu kapsamda, Bakanlık tarafından 2013/09 sayılı "Canlı Hayvan ve Hayvansal Ürünlerde Kalıntı İzleme Genelgesi" ile kalıntı izleme konusunda yetkili referans laboratuvarlar belirlenmiştir (TGK, 2013). Bu laboratuvar Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Ankara Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü ve TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi’dir.

Ayrıca, 2018 yılında veteriner hekimlikte başlatılan e-reçete uygulamasıyla, gıda değeri olan hayvanlarda kullanılan ilaçların ve kalıntı arınma sürelerinin veteriner hekimler, mezbahalar, işletmeler ve bakanlık tarafından izlenebilmesi ve böylece “Ulusal Kalıntı İzleme Planı’na katkı sağlanması planlanmaktadır (Kaya, 2018).

2.7. Antimikrobiyal Kalıntı Analizinde Kullanılan Yöntemler

Gıda kaynaklı ilaç kalıntılarının tespitine yönelik pek çok analitik yöntem geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bu yöntemler, tarama ve doğrulama metotları olarak başlıca iki grupta incelenebilir. Tarama metotları çalışma prensibine göre mikrobiyolojik metotlar, immunokimyasal metotlar ve biyosensörler olarak sınıflandırılmaktadır (Özdemir ve Traş, 2018). En sık kullanılanları mikrobiyolojik ve immunokimyasal yöntemlerdir.

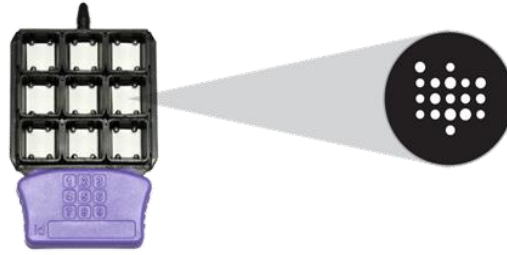
Mikrobiyolojik yöntemler, sıvı ya da katı ortamda kontrollü bir şekilde bulunan *Bacillus spp*, *Escherichia coli* veya *Streptococcus thermophilus* gibi mikroorganizmaların, bulunduğu ortamda meydana getirdiği değişimlerin izlenmesi esasına dayanır. Ortamda antibiyotik varsa bu mikroorganizmalar inhibe olur, antibiyotik yoksa faaliyetlerine devam eder. Buna göre ortamda antibiyotik varlığı belirlenir. Bu yöntem ile antibiyotiklerin belirlenme düzeyi sınırlıdır, antibiyotik varlığı belirlense dahi mikrobiyal inhibisyonun hangi antibiyotik türünden kaynaklandığı spesifik olarak tespit edilemez (Özdemir ve Traş, 2018). Ayrıca gıda maddelerinde katkı ve koruyucuların bulunması hatalı negatif sonuçların elde edilmesine neden olabilir (Chiffmann, Schütz ve Wiesner, 1992). Buna karşın, uygulama yönteminin kolay ve ekonomik olması, çok sayıda örneğin hızlıca taranabilmesi, tespit edebildiği antimikrobiyal çeşidin fazla olmasından dolayı pratikte sıklıkla tercih edilirler (Mitchell, Griffiths ve McEwen, 1998).

İmmunokimyasal metotlar ise, antijen-antikor reaksiyonu sonucu oluşan kompleksin, enzim-substrat ile görünür hale getirilmesi ve spektrofotometrik cihazlarla ile okunması prensibine dayanan yarı kantitatif yöntemlerdir (Yıbar, 2011). Kullanımlarının pratikliği, analizin kısa sürede sonuçlanması ve yüksek duyarlılığa sahip olmaları nedeniyle tercih edilirler (Özdemir ve Traş, 2018). Sahada sıklıkla kullanılan ELISA (enzym-linked immuno sorbent assay) ve çalışmada kullanılan biochip array based immunoassay yöntemi, immunokimyasal analiz yöntemlerindedir.

Biochip array based immunoassay, idrar, dışkı et, süt ve bal gibi matrikslerde kalıntı analizi için kullanılan immünokimyasal tabanlı bir tarama yöntemidir (Oruç,

Rumbeiha, Ensley, Olsen ve Schrunk, 2013). Bu yöntem seçilen matrikste, tek ekstraksiyonla, farklı antimikrobiyal grupları eş zamanlı olarak analiz ederek yarı-kantitatif sonuç verir (Randox Kullanım Kitapçığı, 2016). Biochip array tekniğinde farklı antimikrobiyal gruplar için antimikrobial array (AM) I, II, III, IV ve beta-laktam array (BLACT) gibi farklı kitler bulunmaktadır. Çalışma kapsamında AM II ve BLACT kitleri kullanılmıştır.

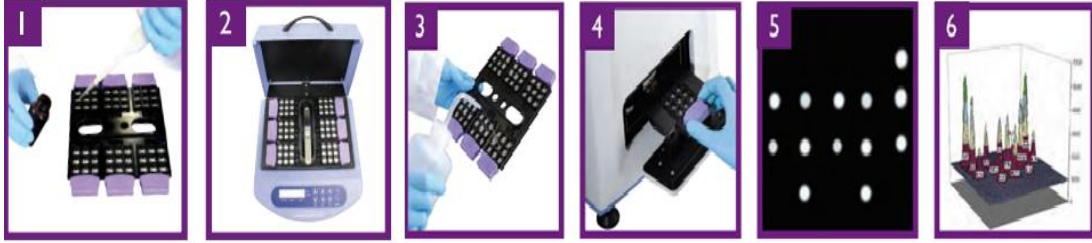
Kompetatif immunokimyasal reaksiyon, üzerinde ayrı test noktaları bulunan ve 3x3'lük 9 kuyucuktan oluşan "carrier"lerin yüzeyinde gerçekleşmektedir. Yüzeyde bulunan test noktaları, farklı antimikrobiallerin eş zamanlı analizini sağlar. Bu sistem, her bir kuyucukta bir numunenin, toplam bir carrierde ise 9 numunenin çalışılmasına olanak verir (Şekil 1).



Şekil 1. Carrier ve yüzeyinde bulunan test noktaları.

Biochip array based immunoassay, kompetatif immunokimyasal reaksiyona ve bu reaksiyon sonucu oluşan sinyalin okunması prensibine göre çalışır. Bu prensipler Şekil 2' de basamaklar halinde (1-6) gösterilmiştir. Buna göre, analizi yapılacak örnek veya standartların ve reaktiflerin kuyucuklara eklenmesi (Şekil 2.1) ve carrierin, karanlık ortam sağlayan ısıtıcılı karıştırıcıda (thermoshaker) inkübe edilmesiyle (Şekil 2.2), immunokimyasal reaksiyon gerçekleşir. Reaksiyonun tamamlanmasından hemen sonra sinyal reaktifinin eklenmesiyle (Şekil 2.3), kuyucuğun yüzeyindeki farklı test bölgelerinde oluşan kemilüminesansın (immunokimyasal reaksiyon sonucu oluşan ışımaya) görünür olması sağlanır. Carrierlerin okutulması, sistemin bir parçası olan Evidence Investigator cihazı tarafından otomatik olarak gerçekleştirilir (Şekil 2.4). Reaksiyon sonucu kuyucuklar üzerindeki ayrı test bölgelerinin her birinden üretilen ışık sinyali aynı anda algılanır (Şekil 2.5). Kullanılan yazılım programı sayesinde, reaksiyonlardan üretilen ışık

sinyali, konsantrasyona çevrilerek (Şekil 2.6), sayısal veriler elde edilir (Randox Kullanım Kitapçığı, 2016).



Şekil 2. Biochip array based immunassay çalışma prensibi (1-6).

Biochip array yöntemi, antimikrobiyal grup bazında ölçüm yapmaktadır. Bu nedenle, rutin tarama amacıyla yapılan analizlerde, tespit edilen konsantrasyonların, antimikrobiyal grup içerisindeki hangi bileşikten kaynaklandığını belirlemek mümkün değildir. Bu çalışmada ise, deney grubunda bulunan hayvana uygulanan antibiyotik bilindiği için, sonuçlarda meydana gelen yüksekliğin (kitapçıkta bildirilen duyarlılık oranları uygulanarak) antimikrobiyal grup içerisindeki hangi bileşikten kaynaklandığı belirlenebilmiştir.

Tarama testleriyle, genellikle antimikrobiyal etkiye sahip herhangi bir antibiyotiği veya belirli bir antibiyotik grubunu nitel yada yarı nicel olarak tespit edebilirken doğrulama yöntemleriyle genellikle numunede bulunduğu düşünülen ya da daha önceden belirlenen hedef bileşiklerin bireysel analizi nicel olarak yapılır (Özdemir ve Traş, 2018). Kromatografik yöntemler, spesifikliği ve duyarlılığı nedeniyle kalıntı analizlerinde önemli yere sahiptir (Yıbar, 2011). Hem bireysel analiz hem de doğrulama amacıyla kullanılırlar. HPLC, LC-MS/MS ve GC-MS kalıntı analizlerinde en sık kullanılan kromatografik yöntemlerdir Ciddi laboratuvar alt yapısı ve uzman personel gerektirdiğinden sahada yaygın olarak kullanımı ekonomik ve pratik değildir. Buna karşın, tarama metotları, çok sayıda antibiyotiği hızlı ve ucuz bir şekilde analiz edebilmesi nedeniyle kabul görmüş ve sağladığı avantajlardan dolayı yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin, çalışma prensibi dolayısıyla numunedeki analit konsantrasyonunu kesin ve eksiksiz olarak tespit etmesi beklenemez. Miktarların net olarak tespiti doğrulama yöntemleriyle yapılır (Yıbar, 2011). Bu nedenle, kalıntı varlığı ve miktarı ile ilgili

kesin yargıya varabilmek için tarama testleri ile elde edilen sonuçların kromatografik yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir.

AB 96/23/EC direktifinde de belirtildiği üzere, gıdalarda bulunabilecek veteriner ilaç kalıntılarının yasal kontrolünde LC-MS/MS ve GC-MS yöntemlerinin kullanılması kararlaştırılmıştır (Coşkun, Erdoğan ve Özdemir, 2012; Daeseleire, Vandeputte ve Van Peteghem, 1998). AB kriterlerine göre, diğer test yöntemleriyle tespit edilen kalıntı konsantrasyonlarının tolerans limitini aştığı beyan edilmeden önce, LC-MS/MS veya GC-MS gibi yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir (Stolker ve Brinkman, 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Deney ve Kontrol Grubu Hayvanlar

Çalışmanın çiftlik ve hayvan uygulamaları kısmı, gerekli etik kurul onayı (06.05.2014, Karar No: 2014/08/01) alındıktan sonra Balıkesir'in Bandırma ilçesinde bulunan Banvit A.Ş'nin besi çiftliğinde, 2015 yılı Temmuz ve Ekim ayları arasında gerçekleştirildi.

Çalışmada kesim yaşına ulaşmış, 1,5 yaşında, Holstein ırkı toplam 32 erkek dana kullanıldı. Her bir antimikrobiyal ilaç için 3'ü deney 1'i kontrol olmak üzere 4 adet besi danasından oluşan çalışma grubu oluşturuldu.

Aynı çalışma grubunda bulunan deney ve kontrol grubu hayvanlar, kulak küpe numaralarına göre kaydedildi ve aynı padok içerisinde barındırıldı. Her bir hayvana ait günlük beden ısısı, yem tüketimi, canlı ağırlık artışı ve genel sağlık durumuna ait veriler kayıt altına alındı (Şekil 3).



Şekil 3. Hayvanların genel kontrollerinin yapıldığı ve numunelerin alındığı ortamlar.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyaller ve Uygulanma Prosedürleri

Çalışmada, veteriner hekimliğinde sahada yaygın olarak kullanılan toplam 8 antimikrobiyal tercih edildi ve prospektüs bilgileri doğrultusunda tedavi dozları esas alınarak deney grubundaki hayvanlara uygulandı (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan ilaçların prospektüs bilgileri.

Antimikrobiyal Bileşik	Ticari Adı	Firma Adı	Uygulama			Yasal Arınma Süresi
			Dozu	Yolu	Süresi	
Seftiofur	Clinexin %5	Bavet	1mg/kg ca	im	1x1, 5 gün	7 gün
Enrofloksasin	Baytril	Bayer	5 mg/kg ca	im	1x1, 5 gün	14 gün
Amoksisilin-Klavulanik asit	Synulox	Zoetis	1ml/20 kg ca	im	1x1, 5 gün	20 gün
Tilosin	Tylan R 200	Elanco	10 mg/kg ca	im	1x1, 5 gün	21 gün
Oksitetrasiklin	Tenaline LA	Ceva	20 mg/kg ca	im	1x3, 2 doz	28 gün
Florfenikol	Florvil	Vilsan	20 mg/kg ca	im	1x2, 2 doz	30 gün
Penisilin G-Streptomisin	Penoksal LA	Vilsan	1ml/20 kg ca	im	1x1, 4 gün	60 gün
Tilmikosin	Makrovil	Vilsan	10 mg/ kg ca	sc	1x1, 1 gün	60 gün

LA: Uzun etkili, im: Kas içi, sc: Deri altı

3.1.3. Numunelerin Toplanması

Deney ve kontrol grubunda bulunan tüm hayvanlardan kesim öncesi, ağız sıvısı (20 ml), kan (4 tüp), dışkı (100 g); kesim sonrası ise karaciğer (200 g), böbrek (200 g), but (200 g), konturfile (200 g) ve pençeta (200 g) numuneleri alındı. Üç farklı bölgeden toplanan kas örnekleri birleştirildi. Kan, ağız sıvısı ve dışkı numuneleri, ilaç uygulamasından önce (0. gün) ve ilaç uygulamaları tamamlandıktan sonra her bir antimikrobiyal için Tablo 2’de belirtilen günlerde toplandı (Şekil 4). Karaciğer, böbrek ve kas numuneleri ise yasal arınma süresi sonlandıktan sonraki kesim gününde alındı (Şekil 5).

Tablo 2. Numunelerin toplanma günleri.

Etken Madde	Yasal Arınma Süresi	Numune Toplama Günleri							
		0	1	3	7	-	-	-	-
Seftiofur	7 gün	0	1	3	7	-	-	-	-
Enrofloksasin	14 gün	0	1	3	10	14	-	-	-
Amoksisilin-Klavulanik asit	20 gün	0	1	3	10	15	20	-	-
Tilosin	21 gün	0	1	3	10	15	21	-	-
Oksitetrasiklin	28 gün	0	1	3	10	20	25	28	-
Florfenikol	30 gün	0	1	3	10	20	25	30	-
Tilmikosin	60 gün	0	1	3	10	30	50	60	-
Penisilin G-Streptomisin	60 gün	0	1	3	10	30	50	60	-

Alınan numuneler küpe numaralarına ve numune alma günlerine göre etiketlendi ve aynı gün soğuk zincir altında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Laboratuvarına getirildi. Penisilin ve amoksisilin gruplarına ait örnekler -80°C 'de, diğer gruplara ait numuneler -18°C ' de analiz gününe kadar muhafaza edildi.



Şekil 4. Kesim öncesi kan, ağız sıvısı ve dışkı numunelerin toplanması.



Şekil 5. Kesim sonrası doku ve organ numunelerin toplanması ve etiketlenmesi.

3.1.4. Analizlerde Kullanılan Kitler

Antimikrobiyal bileşiklerden seftiofur, enrofloksasin, tilosin, oksitetrasiklin, florfenikol ve tilmikosinin analizlerinde Antimicrobial Array II (AM II) EV 3524 (Şekil 6), penisilin-streptomisin ve amoksisilin-klavulanik asidin analizlerinde ise Beta-Lactam Array (BLACT) EV 3793 (Şekil 7) olmak üzere iki farklı test kiti kullanıldı. Analizlerde AM II ve BLACT test kitlerinin içerisindeki solventler ve kullanıma hazır olarak bulunan aynı anda kimyasal ışık veren immüno-reaksiyonların gerçekleştiği 9 kuyucuğa sahip carrierler ile çalışıldı (Şekil 8 ve Şekil 9).



Şekil 6. AM II EV 3524 test kiti.



Şekil 7. BLACT 3793 test kiti.



Şekil 8. Kit içerisindeki biochip carrier.



Şekil 9. Kit içerisindeki malzemeler.

3.1.5. AM II ve BLACT Analizlerinde Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Hazırlanması

- *AM II Assay Diluent (AM II DIL ASY)/ BLACT Assay Diluent (BLACT DIL ASY)* (Randox, AM II EV 3524/ BLACT EV 3793, Birleşik Krallık). Kit içerisinde kullanıma hazır olarak bulunmaktadır.
- *AM II Conjugate (AM II CONJ)/ BLACT Conjugate (BLACT CONJ)* (Randox, AM II EV 3524/ BLACT EV 3793, Birleşik Krallık). Kit içerisinde konsantre olarak bulunmaktadır.
- *AM II Conjugate Diluent (AM II DIL CONJ)/ BLACT Conjugate Diluent (BLACT DIL CONJ)* (Randox, AM II EV 3524/ BLACT EV 3793, Birleşik Krallık). Kit içerisinde kullanıma hazır olarak bulunmaktadır.
- *Working Strength Conjugate (WSC)*. Kit içerisinde bulunan AM II DIL CONJ/ BLACT DIL CONJ'tan 1 ml alınarak AM II CONJ/ BLACT CONJ'ın içerisine ilave edildi. 20-25°C'de sistemin kendi karıştırıcısı olan thermoshakerda 15 dk karıştırıldı. Dilue edilmiş AM II CONJ/ BLACT CONJ'ın AM II DIL CONJ/ BLACT DIL CONJ ile 1:9 oranında dilue edilmesiyle hazırlandı.

- *LUM-EV805 ve Peroxide* (Randox, AM II EV 3524/ BLACT EV 3793 Birleşik Krallık). Kit içerisinde kullanıma hazır olarak bulunmaktadır.
- *Working Signal Reagent (WSR)*. Kit içerisinde bulunan Luminal-EV805 ve Peroxide'in 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.
- *Wash Buffer (WB)* (Randox, AM II EV 3524/ BLACT EV 3793, Birleşik Krallık). Kit içerisinde konsantre olarak bulunmaktadır. Kullanım öncesi dilue edilmiştir.
- *Diluted Wash Buffer (DWB)*. Dilüsyon faktörü 31.25 olacak şekilde 32 ml WB üzerine 868 ml double deionize su ilave edilerek hazırlandı.

3.1.6. Analizlerde Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

- Evidence Investigator otomatik okuyucu sistem (Randox, Birleşik Krallık)
- Thermoshaker (Randox, Birleşik Krallık)
- LC-MS/MS (Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS, USA)
- Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- Double deoinize su cihazı (Purelab, Birleşik Krallık)
- Hassas Terazı (Acculab, ABD)
- Karıştırıcı (Nüve, SL 350, Almanya)
- Santrifüj (Sigma, Almanya)
- Ultra turrax (Janke&Kunkel ıka-werke, Almanya)
- Vorteks (Boeco Vortex, Almanya)

3.1.7. Kullanılan İlaç Standartları

- Oxytetracycline hydrochlorid, (5 mg, Sigma-Aldrich),
- Ceftiofur hydrochlorid, (100 mg, Sigma-Aldrich),
- Enrofloxacin, (100 mg, Sigma-Aldrich),
- Tylosin tartarate, (100 mg, Sigma-Aldrich),
- Tilmicosin, (100 mg, Sigma-Aldrich),
- Amoxicillin trihydrate, (250 mg, Sigma-Aldrich),
- Penisilin G procaine, (200 mg, Sigma-Aldrich).
- Florfenicol, (500 mg, Sigma-Aldrich).

3.2. Yöntem

3.2.1. Numunelerin Hazırlanması

- Kan örnekleri 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi.
- Ağız sıvısı örnekleri sap, saman gibi fiziksel kirliliklerden temizlendi.
- Dışkı örnekleri cam baget ile karıştırılarak homojenize edildi.
- Doku örnekleri önce küçük parçalara ayrıldı sonrasında ultra-turrax ile homojenize edildi (Şekil 10).



Şekil 10. Doku ve organ örneklerinin küçük parçalara ayrılması ve ultra-turrax ile homojenizasyonu.

3.2.2. Ekstraksiyon Yöntemleri

3.2.2.1. Serum Ekstraksiyon Yöntemleri

3.2.2.1.1. AM-II Analizi Ekstraksiyon Yöntemi

Serum örneklerinden 3 ml alınarak 0,4 µm acrodisc filtre ile filtre edildi. Elde edilen filtrattan 100 µl alındı ve 900 µl DWB ile dilue edilerek analiz için hazır hale getirildi.

3.2.2.1.2. BLACT Analizi Ekstraksiyon Yöntemi

Serum örneklerinin BLACT yöntemine göre ekstraksiyon prosedürü AM-II yönteminin prosedürü ile aynıdır.

3.2.2.2. Ağız Sıvısı Ekstraksiyon Yöntemleri

3.2.2.2.1. AM-II Analizi Ekstraksiyon Yöntemi

Ağız sıvısı örneklerinden 1 ml alındı ve oda sıcaklığında 5000 rfc'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen supernatanttan 50 µl alındı ve 450 µl DWB ile dilue edilerek analiz için hazır hale getirildi.

3.2.2.2.2. BLACT Analizi Ekstraksiyon Yöntemi

Ağız sıvısı örneklerinin BLACT yöntemine göre ekstraksiyon prosedürü AM-II yönteminin prosedürü ile aynıdır.

3.2.2.3. Dışkı ve Doku Ekstraksiyon Yöntemleri

3.2.2.3.1. AM-II Analizi Ekstraksiyon Yöntemi

Homojenize edilmiş dışkı/doku örneğinden 1 g alındı ve üzerine 9 ml DWB eklenerek 30 saniye vortex ile karıştırıldı. Sonrasında oda sıcaklığında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan 200 µl alındı ve 200 µl DWB ile dilue edilerek analiz için hazır hale getirildi.

3.2.2.3.2. BLACT Analizi Ekstraksiyon Yöntemi

Homojenize edilmiş dışkı/doku örneğinden 1 g alındı ve üzerine 19 ml DWB eklenerek 1 dakika vortex ile karıştırıldı. Ardından oda sıcaklığında 2880 rcf'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan 100 µl alınarak analize geçildi.

3.2.3. AM II ve BLACT Yöntemine Ait Validasyonlar

Tüm standartlar 1mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Geri kazanım (recovery) çalışması için tüm standartlar distile suda, enrofloksasin metanol/su karışımında çözdürüldü.

Geri kazanım değerlerini hesaplamak için kontrol grubuna ait kan, ağız sıvısı ve dışkı örnekleri ile çalışıldı. Kan ve ağız sıvısı örnekleri 2 ml, dışkı örnekleri ise 2 g alınarak Tablo 3'te belirtilen konsantrasyonlarda standartlar eklendi ve

ekstraksiyon metodu aynen uygulandı. Standart eklenen ve eklenmeyen numunelerin analizleri yapıldı ve sonuçlarının ortalamaları alındı. Standart eklenen ve eklenmeyen numuneler arasındaki fark hesaplanarak % geri kazanımlar belirlendi. Florfenikol, penisilin ve amoksisilin için ise kit yetersizliği nedeniyle geri kazanım değerleri belirlenememiştir.

Tablo 3. Geri kazanım çalışmasında kullanılan örnekler ve uygulanan konsantrasyonlar.

Antimikrobiyaller	Kan ve Ağız sıvısı (ng/ml)			Dışkı (ng/g)		
	K-1	K-2	K-3	K-1	K-2	K-3
Oksitetrasiklin	2	1	-	2	1	-
Seftiofur	4	2	1	4	2	1
Enrofloksasin	8	4	2	8	4	2
Tilosin	4	2	1	4	2	1
Tilmikosin	4	2	1	4	2	1
Amoksisilin	*	*	*	*	*	*
Penisilin G	*	*	*	*	*	*
Florfenikol	*	*	*	*	*	*

K: Konsantrasyon, *Kit yetersizliği nedeniyle çalışılmayan örnekler.

Kullanılan metot doku numuneleri (karaciğer, böbrek ve kas) için valide edilmiş olduğundan bu numunelere kullanım kitapçığında belirtilen ve Tablo 4'te gösterilen cross-reaktivite değerleri uygulandı (Randox Kullanım Kitapçığı, 2016). Doku numuneleri için firma tarafından tanımlanan ölçüm aralığı (assay range) değerleri Tablo 4'te gösterilmiştir (Randox Kullanım Kitapçığı, 2016). Kan, ağız sıvısı ve dışkı örnekleri için de bu değerler dikkate alınmıştır.

Tablo 4. AM II ve BLACT yöntemine ait cross reaktivite ve ölçüm aralığı değerleri.

	Antimikrobiyal Bileşikler	Cross-Reaktivite %	Ölçüm Aralığı (ng/g)		Antimikrobiyal Bileşikler	Cross-Reaktivite %	Ölçüm Aralığı (ng/g)				
KİNOLONLAR	Norfloksasin	100	0-11,50	TETRASİKLINLER	Tetrasiklin	100	0-2,50				
	Pefloksasin	84			4-epitetrasiklin	87					
	*Enrofloksasin	76			Rolitetrasiklin	67					
	*Siprofloksasin	59			*Oksitetrasiklin	52					
	Ofloksasin	57			*4-epioksitetrasiklin	52					
	Enoksasin	54			Klortetrasiklin	51					
	Orbifloksasin	23			4-epiklortetrasiklin	20					
	Danofloksasin	20			Doksisiklin	23					
	Marbofloksasin	16			Demeklosiklin	41					
	Difloxacin	8			Metasiklin	11					
	SEFTİOFUR	*Seftiofur			100	0-7,00		BETA-LAKTAMLAR	Ampisilin	100	0-6,00
		*Desfuroylseftiofur			92				*Amoksisilin	59	
Amoksisilin		<1	Dikloksasilin	70							
Ampisilin		<1	Kloksasilin	52							
Dikloksasilin		<1	Oksasilin	47							
Kloksasilin		<1	*Penisilin G	388							
Sefadroksil		<1	Penisilin V	246							
Sefazolin		<1	Sefazolin	6							
Oksasilin		<1	Sefaperozon	105							
Tikarsilin		<1	Sefkuinom	12							
TIAMFENİKOL		*Florfenikol	100	0-5,00	TİLOSİN		*Tilosin		100	0-5,00	
	Tiamfenikol	53	*Tilmikosin			37					
	*Florfenikol amin	<1	Basitrasin			<1					
	Norfloksasin	<1	Eritromisin			<1					
	Ceftiofur	<1	Josamisin			<1					
	Tilosin	<1	Olendomisin			<1					
	Streptomisin	<1	Sipramisin			<1					

3.2.4. AM II ve BLACT Kitlerinin Analiz Prosedürü

AM II ve BLACT kitlerinin analiz prosedürü aynıdır ve aşağıda belirtilmiştir (Randox Kullanım Kitapçığı, 2016).

Çalışılacak test kiti oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika bekletildikten sonra analize başlandı. Öncelikle carrierin tüm kuyucuklarına 100 µl assay dilüentlerden (AM II DIL ASY/ BLACT DIL ASY) eklendi. Üzerine ekstraksiyonu tamamlanarak analize hazır hale getirilmiş numunelerden 100 µl alınarak her bir kuyucukta bir numune çalışılacak şekilde ilgili kuyucuğa aktarıldı. Sonrasında kuyucukları taşıyan

carrier 25 °C'de 370 rpm'de 30 dakika thermoshakerda inkübe edildi (Şekil 11). İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 100 µl WSC ilave edildi ve carrier 25 °C'de 370 rpm'de 60 dakika thermoshakerde tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası carrier üzerindeki solüsyonlar dökülerek uzaklaştırıldı ve ardından yaklaşık 350 µl DWB ile iki kısa ve dört uzun süreli olmak üzere yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son yıkamadan sonra tüm kuyucuklara 250 µl WSR eklendi ve 2 dakika karanlıkta bekletildi.

3.2.5. AM II ve BLACT Görüntüleme/Okutma İşlemi

WSR eklenmiş olan carrier tam 2 dakika sonra Evidence Investigator'a yerleştirildi. Sonuçların okunması Evidence Investigator cihazı ile otomatik olarak gerçekleştirildi (Şekil 12). Evidence Investigator görüntüleme yazılımı (Şekil 12) kullanılarak numune bilgileri ve dilüsyon faktörleri sisteme kaydedildi. Dilüsyon faktörleri ağız sıvısı ve serum numuneleri için 10, dışkı ve doku numuneleri için 20'dir.



Şekil 11. Thermoshaker.



Şekil 12. Evidence Investigator cihazı

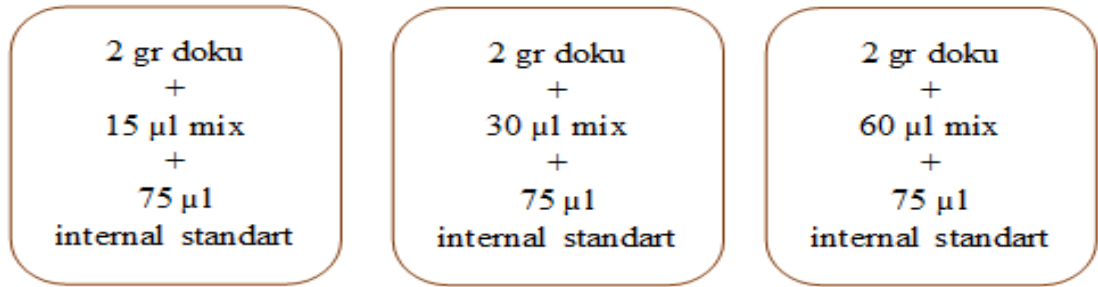
3.2.6. LC-MS/MS Analizleri

Biochip array analiz sonuçlarına göre yüksek pozitiflik gösteren veya sistemin ölçebildiği maksimum değer üzerinde sonuç alınan numunelerin bir kısmı LC-MS/MS ile analiz edilerek doğrulandı. Analizler Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Doping Laboratuvarında gerçekleştirildi. 6 adet karaciğerde (1 oksitetrasiklin, 3 tilosin, 1 tilmikosin ve 1 florfenikol), 4 adet böbrekte (1 oksitetrasiklin, 3 tilosin) ve 1 adet kas numunesinde amoksisilin analizi yapıldı.

Doku ekstraksiyonu ve LC-MS/MS analizlerinde Geis-Asteggiante ve diğerlerinin (2012) bildirdiği metot kullanıldı. Antimikrobiyal standartları 1mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Oksitetrasiklin ve florfenikol metanolde; enrofloksasin tilosin, tilmikosin ve penisilin G metanol/su karışımında; amoksisilin etanolde çözdürüldü.

3.2.6.1. Kalibrasyon Eğrisi

Kontrol hayvanına ait içerisinde antimikrobiyal olmadığı bilinen homojenize edilmiş 2 g dokuya (karaciğer/ böbrek/ kas) MRL'in 0,5; 1 ve 2 katı oranında antibiyotik karışımı ve 75 µl internal standart (sulfametaxanol-d4) eklendi (Şekil 13). Ekstraksiyon prosedürü aynen uygulandı. Antibiyotik karışım konsantrasyonları ve hazırlanışları Tablo 5'te verilmiştir.



Şekil 13. Kalibrasyon eğrisi için üç farklı konsantrasyonda hazırlanan karışımlar.

Tablo 5. Dokularda kalibrasyon eğrisi için hazırlanan konsantrasyonlar.

	Referans standart Kodu	Standart konsantrasyon (µg/ml)	Alınan miktar (ml)	Mix standart konsantrasyon (ng/ml)	2 g numuneye 15 µl eklendiğinde oluşan konsantrasyon ng/g	2 g numuneye 30 µl eklendiğinde oluşan konsantrasyon ng/g	2 g numuneye 60 µl eklendiğinde oluşan konsantrasyon ng/g
KARACİĞER	OTC	1000	*0,2	20000	150	300	600
	TYL	1000	*0,06	6666	50	100	200
	TM	1000	*0,66	66660	500	1000	2000
	FFC	1000	*2,00	200000	1500	3000	6000
BÖBREK	OTC	1000	*0,40	40000	300	600	900
	TYL	1000	*0,06	6660	50	100	200
KAS	AMX	1000	*0,03	3340	25	50	100

OTC: Oksitetrasiklin, TYL: Tilosin, TM: Tilmikosin, AMX: Amoksisilin, FFC: Florfenikol. *10 ml'ye metanol ile tamamlandı.

3.2.6.2. Ekstraksiyon Yöntemi

2 g doku numunesi 50 ml'lik tüplere alındı ve homojenize edilip üzerine 10 ml asetonitril/su (4/1, v/v) karışımı eklendi. Vortekte 5 dakika karıştırılıp, 3700 rfc'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

Supernatant Dispersive Solid Phase Extraction (DSPE) Clean-up işlemi için, QuEChERS ECC1850CT santrifüj tüpü içerisine alındı. 10 ml hekzan eklenerek, 30 saniye vortekte karıştırıldı ve 3700 rfc'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan faz farkından yararlanarak hekzan aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırıldı. 5 ml ekstrakt 45° C'de azot altında uçuruldu ve üzerine % 0,1'lik formik asitli su eklenerek 1 ml'ye tamamlandı. Numune 0,2 µm PVDF membran filtreden geçirilerek analiz için hazır hale getirildi.

*DSPE, çeşitli bileşiklerin analizi için bir ekstraksiyon tekniği olarak kullanılmıştır. Bu teknik, karmaşık matrislerden farklı analitlerin ekstraksiyonu, izolasyonu ve temizliğinde kullanılır. DSPE, çeşitli alanlarda geniş bir uygulama yelpazesi bulmuştur ve seçici ve çok yönlü bir teknik olarak kabul edilmektedir.

3.2.6.3. LC-MS/MS Analiz Şartları

Taşıyıcı solvent olarak mobil faz A (% 0,1'lik formik asit/su, v/v) ve mobil faz B (% 0,1'lik formik asit/asetonitril, v/v) kullanıldı. Analizler gradient 0,2 ml/ dk akış hızında gerçekleştirildi. Mobil faz akış programı Tablo 6'da sunulmuştur. Analizler Agilent Masshunter Workstation yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 6. Mobil faz akış tablosu.

Zaman dk	Mobil faz A %	Mobil Faz B %
0:00	90	10
05:00	85	15
07:00	80	20
11:00	60	40
15:00	40	60
16:00	90	10
20:00	90	10

Mobil faz A (% 0,1 formik asit-su), mobil faz B (% 0,1 formik asit-asetonitril).

4. BULGULAR

Analiz sonuçları serum, ağız sıvısı ve dışkı için geri kazanım ve cross-reaktivite değerleri dikkate alınarak hesaplandı (Tablo 7 ve Tablo 8). Doku numuneleri (karaciğer, böbrek ve kas) için kullanılan metot valide edilmiş olduğundan yalnızca cross-reaktivite değerleri uygulandı (Tablo 8). Amoksisilin, penisilin G ve florfenikol için kit yetersizliği nedeniyle geri kazanım değerleri belirlenemedi (Tablo 7).

Tespit edilen değerler, TGK'de (2017) maksimum kalıntı limitleri için tanımlanan belirleyici kalıntı türüne göre ana molekül ya da metabolit üzerinden hesaplanarak verildi (Tablo 8).

Çalışmada, 0. gün ve kontrol hayvanlarına ait değerlerinin üzerinde kalan miktarlar pozitiflik, sistemin tespit edebildiği maksimum konsantrasyonun üzerinde kalan miktarlar ise yüksek pozitiflik olarak değerlendirildi.

Tablo 7. Serum, ağız sıvısı ve dışkı numunelerine ait geri kazanım değerleri (%).

Antimikrobiyaller	Geri Kazanım Değerleri		
	Serum	Ağız Sıvısı	Dışkı
Oksitetrasiklin	32	33	1
Seftiofur	1290	135	9
Enrofloksasin	400	188	4
Tilosin	180	546	115
Tilmikosin	33	136	15
Amoksisilin	*	*	*
Penisilin G	*	*	*
Florfenikol	*	*	*

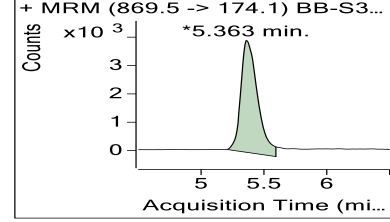
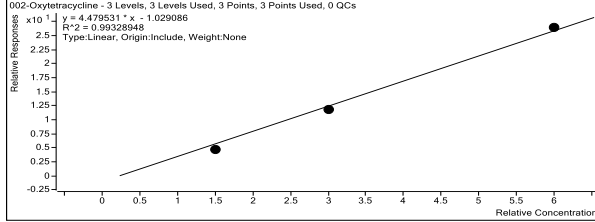
*Kit yetersizliği nedeniyle geri kazanım değerleri hesaplanamamıştır.

Tablo 8. Antimikrobiyal bileşiklere ait aktif madde ve metabolitlerinin cross-reaktivite değerleri ve MRL için tanımlanan belirleyici kalıntı türü (%).

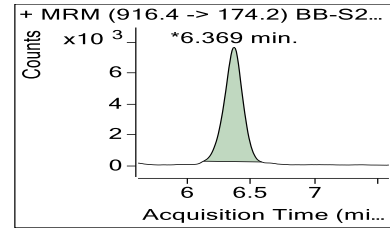
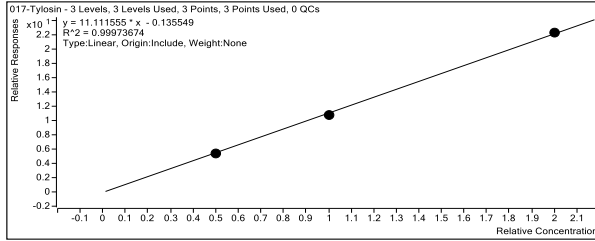
Aktif Madde	Cross-Reaktivite	Metaboliti	Cross-Reaktivite	MRL Belirleyici Kalıntı
Enrofloksasin	76	Siprofloksasin	59	Enrofloksasin ve siprofloksasin toplamı
Seftiofur	100	Desfuroylseftiofur	92	Desfuroylseftiofur olarak ifade edilen kalıntıların toplamı
Florfenikol	100	Florfenikol amin	<1	Florfenikol ve florfenikol amin toplamı
Tilosin	100	-	-	Tilosin A
Tilmikosin	37	-	-	Tilmikosin
Oksitetrasiklin	52	4-Epioksitetrasiklin	52	Ana Madde ve 4- Epimerleri toplamı
Penisilin G	388	-	-	Benzilpenisilin (Penisilin G)
Amoksisilin	59	-	-	Amoksisilin

Antimikrobiyallerin LC-MS/MS ile çizdirilen kalibrasyon eğrileri ve kromatogramları Şekil 14'te gösterilmiştir. Buna göre, korelasyon katsayıları (R²) oksitetrasiklin, tilosin, tilmikosin ve florfenikol için >0,99 iken, amoksisilin için 0,77 olarak belirlenmiştir.

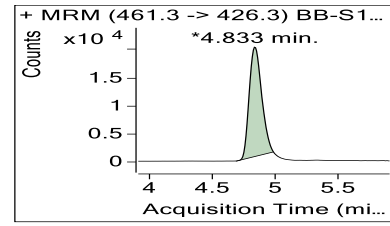
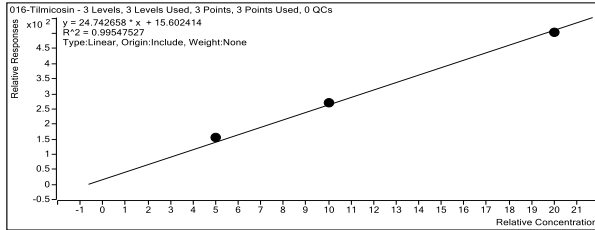
Oksitetrasiklin



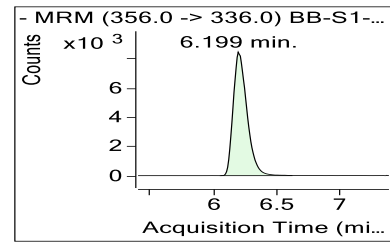
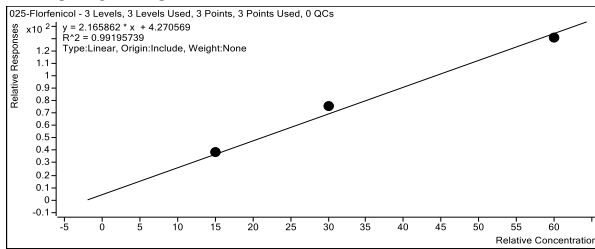
Tilosin



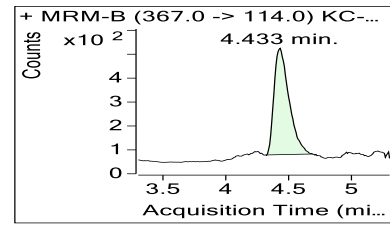
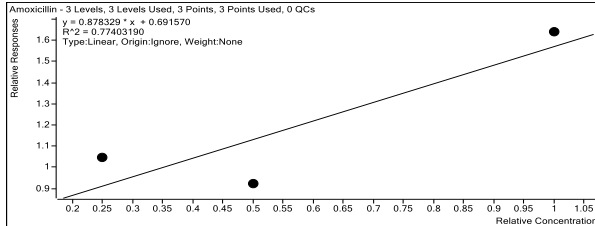
Tilmikosin



Florfenikol



Amoksisilin



Şekil 14. Antimikrobiyallere ait LC/MS-MS kromatogramları ve kalibrasyon eğrileri.

4.1. Oksitetrasiklin

Oksitetrasiklin serum, ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde tespit edildi (Tablo 9).

Serum örneklerinde tespit edilen oksitetrasiklin değerleri 1, 3 ve 10. günlerde maksimum konsantrasyonlarda seyrederken, 20. gün itibariyle azalmaya başlamıştır. Ancak 28. günün sonunda değerlerin hala 0. gün ve kontrol değerlerinin üzerinde seyrettiği görülmüştür (Tablo 9). Ağız sıvısı örneklerine ait değerler 1. gün göreceli bir yükselme gösterirken, 3. gün belirgin bir düşüşe geçmiş ve 20. günün sonunda 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 9). Dışkı örneklerine ait değerler 1. ve 3. günlerde maksimum konsantrasyonlarda seyrederken, 10. gün itibariyle azalmaya başlamış; 25. günde kontrol değerlerine düşmüştür (Tablo 9). Dışkı örneklerine ait kontrol numunelerinde yüksek miktarda pozitiflikler bulunmaktadır.

Tablo 9. Oksitetrasiklinin AM II ile serum, ağız sıvısı ve dışkıda tespit edilen miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$, $\mu\text{g}/\text{l}$).

Numuneler	Numune Kodu	Numune Alma Günleri						
		0	1	3	10	20	25	28
Serum	OTC-D1	50,73	*>28,80	*>28,80	*>28,80	1680,83	1068,63	765,08
	OTC-D2	48,98	*>28,80	*>28,80	*>28,80	*>28,80	914,90	748,02
	OTC-D3	48,98	*>28,80	*>28,80	*>28,80	1143,58	886,90	423,81
	OTC-K1	47,65	72,96	83,23	70,67	54,02	62,44	58,00
Ağız Sıvısı	OTC-D1	0,00	1227,27	581,77	21,56	10,79	1,40	15,44
	OTC-D2	0,00	810,85	94,58	39,15	13,75	0,00	5,08
	OTC-D3	17,94	281,88	52,56	12,29	4,13	6,23	0,00
	OTC-K1	8,87	29,54	6,46	7,92	5,60	0,00	7,12
Dışkı	OTC-D1	352,08	*>57,60	*>57,60	41360,77	7718,94	3125,73	6497,04
	OTC-D2	659,77	*>57,60	*>57,60	64291,35	10792,90	4772,19	3587,27
	OTC-D3	708,58	*>57,60	*>57,60	45680,77	6562,13	4347,63	5477,81
	OTC-K1	803,25	3746,15	6186,38	1002,88	5850,60	5683,42	4431,96

OTC: Oksitetrasiklin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyonun üzerinde.

Oksitetrasiklin karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilebilmiştir (Tablo 10).

Karaciğer örneklerinde 1 ve 3 numaralı deney hayvanlarına ait değerlerin (>57,60 µg/kg) maksimum kalıntı limitini (300 µg/kg) aşabileceği görülmüştür (Tablo 10). Böbrek örneklerinde 3 numaralı deney hayvanına ait değer (>57,60 µg/kg) maksimum kalıntı limitini (600 µg/kg) aşabilme ihtimali bulunmaktadır (Tablo 10). Kas örneklerinde tüm değerlerin maksimum kalıntı limitini aşmadığı görülmektedir (Tablo 10).

Tablo 10. Oksitetrasiklinin AM II ile karaciğer, böbrek ve kaslarda tespit edilen miktarları ve MRL değerleri (µg/kg).

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek		Kas	
	AM II	MRL	AM II	MRL	AM II	MRL
OTC-D1	*>57,60	300	324	600	51,42	100
OTC-D2	166,76		61,06		73,16	
OTC-D3	*>57,60		*>57,60		64,55	
OTC-K1	17,27		15,69		57,91	

OTC: Oksitetrasiklin D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, MRL: Maksimum kalıntı limiti, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyonun üzerinde.

Biochip Array sonuçlarına göre kalıntı limitlerini aşma ihtimali bulunan 3 numaralı deney hayvanına ait karaciğer ve böbrek örneklerinin LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı. Buna göre karaciğer ve böbrek örneklerine ait AM II sonuçları >57,60 µg/kg iken, LC-MS/MS ile elde edilen sonuçlar sırasıyla 24,29 µg/kg ve 4,53 µg/kg olarak tespit edildi ve maksimum kalıntı limitlerini aşmadığı görüldü (Tablo 11).

Tablo 11. Doğrulaması yapılan örneklerin AM II ve LC-MS/MS miktarları (µg/kg).

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek	
	AM II	LC-MS/MS	AM II	LC-MS/MS
OTC-D3	>57,60	24,29	>57,60	4,53

OTC: Oksitetrasiklin D: Deney hayvanı.

4. 2. Seftiofur

Desfuoylseftiofur, seftiofurun ana metabolitidir ve aynı zamanda farmakolojik olarak aktif bir bileşiktir (Beconi-Barker ve diğerleri, 1995; Salmon, Watts ve Yancey, 1996). Seftiofurun uygulandıktan sonra hızlıca desfuoylseftiofura dönüştüğü bildirilmektedir (EMEA, 1999a). Bu nedenle çalışmada AM II ile elde edilen sonuçlar desfuoylseftiofur üzerinden hesaplanmıştır. AM II sonuçlarına göre desfuoylseftiofurun sığır ağız sıvısında tespit edilebildiği, serum ve dışkı örneklerinde ise sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği belirlenmiştir (Tablo 12).

Serum ve ağız sıvısı örneklerinde tespit edilen desfuoylseftiofur değerleri 1. günde yükselmiş, 3. gün itibariyle azalarak, 7. gün itibariyle 0. gün ve kontrol değerlerine yaklaşmıştır (Tablo 12). Dışkı örneklerine ait değerler 1. gün maksimum konsantrasyona ulaşmış, 3. gün itibariyle 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 12). Dışkı örneklerine ait 0. gün ve kontrol numunelerinde, oksitetrasiklinde olduğu gibi yüksek miktarda pozitiflikler bulunmaktadır.

Tablo 12. Desfuoylseftiofurun AM II ile serum, ağız sıvısı ve dışkıda tespit edilen miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$, $\mu\text{g}/\text{l}$).

Numuneler	Numune Kodu	Numune Alma Günleri			
		0	1	3	7
Serum	DCEF-D1	0,90	53,48	3,08	1,16
	DCEF-D2	0,95	54,37	2,89	1,09
	DCEF-D3	1,02	38,26	3,00	1,28
	DCEF-K1	0,89	0,67	0,63	0,60
Ağız Sıvısı	DCEF-D1	2,80	17,65	4,35	6,21
	DCEF-D2	1,97	10,32	3,43	4,93
	DCEF-D3	3,53	54,43	6,39	4,35
	DCEF-K1	3,83	11,14	1,12	4,63
Dışkı	DCEF-D1	346,24	1059,72	318,76	158,65
	DCEF-D2	298,73	2222,52	172,21	218,00
	DCEF-D3	299,59	982,04	230,46	148,88
	DCEF-K1	321,82	434,66	127,50	204,57

DCEF: Desfuoylseftiofur, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı.

AM II sonuçlarına göre, desfuroylseftiofur karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilebilmiştir (Tablo 13).

Karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin maksimum kalıntı limitlerini aşmadığı belirlenmiştir (Tablo 13).

Tablo 13. Desfuroylseftiofurun AM II ile karaciğer, böbrek ve kaslarda tespit edilen miktarları ve MRL değerleri ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek		Kas	
	AM II	MRL	AM II	MRL	AM II	MRL
DCEF-D1	71,21	2000	44,17	6000	16,73	1000
DCEF-D2	42,63		87,71		5,48	
DCEF-D3	224,98		23,13		6,90	
DCEF-K1	11,51		11,73		5,36	

DCEF: Desfuroylseftiofur, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, MRL: Maksimum kalıntı limiti.

4.3. Enrofloksasin

AM II sonuçlarına göre enrofloksasinin sığır serum ve ağız sıvısında tespit edilebildiği, dışkı örneklerinde ise sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği belirlenmiştir (Tablo 14).

Serum örneklerinde tespit edilen enrofloksasin değerleri 1. günde yükselmiş, 3. gün itibariyle ciddi oranda azalmaya başlamış ve 15. günün sonunda 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 14). Serum numunesinde, 1 numaralı deney hayvanının 10. gün sonucu ($20,00 \mu\text{g}/\text{kg}$), aynı güne ait diğer sonuçlara ($0,00 \mu\text{g}/\text{kg}$) ve yedi gün önceki kendi değerine göre ($11,74 \mu\text{g}/\text{kg}$) yüksek tespit edilmiştir (Tablo 14).

Ağız sıvısı örneklerinde tespit edilen enrofloksasin değerleri 1. gün yükseliş göstermiş, 3. gün itibariyle azalmaya başlamış, 10. günde 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 14).

Dışkı örneklerindeki enrofloksasin konsantrasyonları 1. gün maksimum konsantrasyona ulaşmış, 10. gün azalmaya başlamış ve 15. gün sonunda hala 0. gün ve kontrol değerlerinin üzerinde seyretmiştir. Kontrol hayvanına ait dışkı

numunelerinde oksitetrasiklin ve seftiofurda olduğu gibi yüksek miktarda pozitiflik tespit edilmiştir (Tablo 14).

Tablo 14. Enrofloksasinin AM II ile serum, ağız sıvısı ve dışkıda tespit edilen miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$, $\mu\text{g}/\text{l}$).

Numuneler	Numune Kodu	Numune Alma Günleri				
		0	1	3	10	15
Serum	ENR-D1	0,00	73,36	11,74	20,00	0,00
	ENR-D2	0,00	43,03	8,42	0,00	0,00
	ENR-D3	0,00	100,08	11,75	0,00	0,33
	ENR-K1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ağız Sıvısı	ENR-D1	1,95	71,87	28,05	0,04	0,89
	ENR-D2	18,42	70,32	50,54	0,68	0,68
	ENR-D3	0,00	100,03	69,00	13,11	11,28
	ENR-K1	3,26	15,72	45,04	2,20	1,68
Dışkı	ENR-D1	10,86	*>57,60	17667,11	420,72	477,30
	ENR-D2	0,00	*>57,60	10628,62	395,39	1093,09
	ENR-D3	0,00	*>57,60	20893,09	839,14	1577,63
	ENR-K1	0,00	2101,97	1698,36	3011,18	493,42

ENR: Enrofloksasin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyonun üzerinde.

AM II sonuçlarına göre, siprofloksasin karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin maksimum kalıntı limitlerini aşmadığı görülmektedir (Tablo 15).

Tablo 15. Siprofloksasinin AM II ile karaciğer, böbrek ve kaslarda tespit edilen miktarları ve MRL değerleri ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek		Kas	
	AM II	MRL	AM II	MRL	AM II	MRL
SPR-D1	127,11	300	0,00	200	0,00	100
SPR-D2	53,76		0,00			
SPR-D3	12,42		0,00			
SPR-K1	0,00		0,00			

SPR: Siprofloksasin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, MRL: Maksimum kalıntı limiti.

4.4. Tilosin

Tilosin serum, ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde tespit edilmiştir (Tablo 16).

Serum ve dışkı örneklerinde tespit edilen tilosin değerleri 1. ve 3. günlerde maksimum konsantrasyonda seyrederken 10. gün itibariyle azalmaya başlamıştır. Ancak 21. günün sonunda değerlerin 0. gün ve kontrol değerlerine yakın olmakla birlikte, genellikle üzerinde seyrettiği görülmektedir (Tablo 16). Dışkı örneklerinde, kontrol hayvanına ait 15. gün değeri (>87,00 µg/kg), 0. gün ve diğer kontrol sonuçlarına göre yüksek tespit edilmiştir (Tablo 16).

Ağız sıvısı örneklerinde 2 ve 3 numaralı deney hayvanında tespit edilen tilosin değerleri 1. gün maksimum konsantrasyona ulaşmış, 3. gün itibariyle azalmaya başlamış; 10. gün itibariyle 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 16).

Tablo 16. Tilosinin AM II ile serum, ağız sıvısı ve dışkıda tespit edilen miktarları (µg/kg, µg/l).

Numuneler	Numune Kodu	Numune Alma Günleri					
		0	1	3	10	15	21
Serum	TYL-D1	3,02	*>43,50	*>43,50	53,58	52,67	22,88
	TYL-D2	4,33	*>43,50	*>43,50	86,12	55,99	42,42
	TYL-D3	4,17	*>43,50	205,11	52,78	31,13	39,26
	TYL-K1	4,30	35,85	21,42	12,81	12,48	6,35
Ağız Sıvısı	TYL-D1	5,47	6,15	16,08	3,81	18,99	0,60
	TYL-D2	7,13	*>43,50	50,14	9,38	4,61	7,31
	TYL-D3	2,23	*>43,50	17,22	2,80	2,82	4,30
	TYL-K1	2,05	16,11	11,16	8,31	3,62	2,20
Dışkı	TYL-D1	5,49	*>87,00	*>87,00	205,78	117,87	78,27
	TYL-D2	4,23	*>87,00	*>87,00	118,83	106,59	67,83
	TYL-D3	6,02	*>87,00	*>87,00	19,51	68,21	27,08
	TYL-K1	4,80	64,90	72,59	52,57	*>87,00	63,30

TYL: Tilosin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyonun üzerinde.

Tilosin karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilebilmiştir (Tablo 17).

Karaciğer örneklerinde 3 deney hayvanına ait değerlerin (>87.00 µg/kg) karaciğer için 100 µg/kg olan maksimum kalıntı limitini aşabileceği görülmüştür (Tablo 17). Böbrek örneklerinde 2 deney ve 1 kontrol hayvanına ait değerlerin (>87.00 µg/kg) böbrek için 100 µg/kg olan maksimum kalıntı limitini aşma ihtimali bulunmaktadır (Tablo 17). Kas örneklerinde deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin maksimum kalıntı limitini aşmadığı tespit edilmiştir (Tablo 17).

Tablo 17. Tilosinin AM II ile karaciğer, böbrek ve kaslarda tespit edilen miktarları ve MRL değerleri (µg/kg).

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek		Kas	
	AM II	MRL	AM II	MRL	AM II	MRL
TYL-D1	*>87,00	100	*>87,00	100	36,44	100
TYL-D2	*>87,00		*>87,00		36,28	
TYL-D3	*>87,00		86,38		22,81	
TYL-K1	3,70		*>87,00		6,34	

TYL: Tilosin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, MRL: Maksimum kalıntı limiti, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyonun üzerinde.

Biochip Array analizine göre >87,00 µg/kg olarak sonuç veren ve kalıntı limitlerini aşma ihtimali bulunan tüm karaciğer ve böbrek örneklerinin LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı. LC-MS/MS sonuçlarına göre karaciğer örneklerindeki 1 ve 2 numaralı deney hayvanına ait değerler ile böbrek örneklerindeki 1 numaralı deney hayvanına ait miktarlar sırasıyla 366,79 µg/kg, 474,60 µg/kg, 194,35 µg/kg olarak tespit edildi ve 100 µg/kg olan maksimum kalıntı limitlerini aştığı görüldü (Tablo 18).

Tablo 18. Doğrulaması yapılan örneklerin AM II ve LC-MS/MS miktarları (µg/kg)

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek	
	AM II	LC-MS/MS	AM II	LC-MS/MS
TYL-D1	>87,00	366,79	>87,00	194,35
TYL-D2	>87,00	474,60	>87,00	41,09
TYL-D3	>87,00	84,53	-	-
TYL-K1	-	-	>87,00	6,02

TYL: Tilosin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, (-): Doğrulama yapılmayan numuneler.

4.5. Tilmikosin

Tilmikosin serum, ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde tespit edilmiştir (Tablo 19).

Serum örneklerinde tespit edilen tilmikosin değerlerinin 1. ve 10. günler arasında yüksek konsantrasyonlarda olduğu, 30. gün itibariyle belirgin olarak azaldığı ve 60. günün sonunda 0. gün ve kontrol değerlerine yaklaştığı belirlenmiştir (Tablo 19).

Ağız sıvısı örneklerinde tespit edilen tilmikosin değerleri 1. gün kısmi olarak yükselmiş, 3. gün itibariyle azalmaya başlamış ve 30. günün sonunda 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 19). Buna rağmen 3. gün kontrol değerinin (100,38 µg/kg) deney gruplarından bile yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 19).

Dışkı örneklerinde tespit edilen tilmikosin değerleri 1. gün maksimum konsantrasyona ulaşmış ve 3. gün itibariyle azalmaya başlamıştır. Ancak 60. günün sonunda bile 1 ve 3 numaralı deney hayvanlarına ait değerler (1140,54 µg/kg; 955,84 µg/kg) 0. gün ve kontrol değerlerinin üzerindedir (Tablo 19). Dışkı örneklerinde kontrol değerlerinin genel olarak 0. gün düşük, diğer günler yüksek seyrettiği görülmektedir (Tablo 19).

Tablo 19. Tilmikosinin AM II ile serum, ağız sıvısı ve dışkıda tespit edilen miktarları (µg/kg; µg/l).

Numuneler	Numune Kodu	Numune Alma Günleri						
		0	1	3	10	30	50	60
Serum	TM-D1	78,76	401,76	338,05	235,19	67,51	99,05	73,84
	TM-D2	53,30	359,16	322,49	192,92	63,30	105,95	85,49
	TM-D3	43,49	401,00	368,57	147,62	51,49	67,62	55,54
	TM-K1	44,49	48,65	50,81	53,57	41,57	69,86	47,81
Ağız Sıvısı	TM-D1	5,00	92,32	76,59	77,22	19,97	20,19	4,57
	TM-D2	8,86	85,65	80,35	64,84	40,27	9,35	9,78
	TM-D3	6,73	83,27	62,35	72,57	25,51	17,14	5,41
	TM-K1	4,65	55,32	100,38	28,89	24,00	56,78	11,73
Dışkı	TM-D1	115,76	7550,24	1874,76	1788,43	1197,57	1185,46	1140,54
	TM-D2	149,68	3298,05	2000,57	1457,78	1319,11	855,16	455,92
	TM-D3	75,11	5085,73	1739,05	1167,95	1094,68	1928,05	955,84
	TM-K1	82,19	738,11	909,41	508,86	450,51	498,41	356,57

TM: Tilmikosin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı.

Tilmikosinin karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilebildiği, görülmektedir (Tablo 20).

Karaciğer örneklerinde 1 ve 3 numaralı deney hayvanına ait değerler (>235,14 µg/kg) karaciğer için 1000 µg/kg olan maksimum kalıntı limitini aşabilme ihtimali bulunmaktadır (Tablo 20). Bu kapsamda, 3 numaralı hayvana ait karaciğer örneğinin LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı ve tespit edilen konsantrasyonun (542,31 µg/kg) maksimum kalıntı limitini aşmadığı belirlendi (Tablo 21). Böbrek ve kas örneklerinde deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin maksimum kalıntı limitinin altında olduğu tespit edildi (Tablo 20).

Tablo 20. Tilmikosinin AM II ile karaciğer, böbrek ve kaslarda tespit edilen miktarları ve MRL değerleri (µg/kg).

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek		Kas	
	AM II	MRL	AM II	MRL	AM II	MRL
TM-D1	*>235,14	1000	183,49	1000	27,41	50
TM-D2	225,46		140,11		25,60	
TM-D3	*>235,14		166,38		38,08	
TM-K1	0,00		12,30		8,51	

TM: Tilmikosin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, MRL: Maksimum kalıntı limiti, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyonun üzerinde.

Tablo 21. Doğrulaması yapılan örneğin AM II ve LC-MS/MS miktarları (µg/kg).

Numune Kodu	Karaciğer	
	AM II	LC-MS/MS
TM-D3	>235,14	542,31

TM: Tilmikosin, D: Deney hayvanı.

4.6. Florfenikol

Florfenikolün serum ve dışkı örneklerinde tespit edildiği, ağız sıvısı örneklerinde ise sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği görülmüştür (Tablo 22).

Serum örneklerinde tespit edilen florfenikol değerleri 1. ve 10. günler arasında maksimum konsantrasyonda seyrederken, 25. günün sonunda kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 22).

Ağız sıvısı örneklerinde deney ve kontrol grubuna ait tüm değerlerin (>46,00 µg/kg) aynı olduğu görülmektedir (Tablo 22).

Dışkı örneklerindeki florfenikol konsantrasyonlarının, 1. gün maksimum seviyede olduğu, 3. gün kısmi bir azalış gösterdiği ve 20. gün sonunda kontrol değerlerine indiği tespit edilmiştir (Tablo 22).

Tablo 22. Florfenikolün AM II ile serum, ağız sıvısı ve dışkıda tespit edilen miktarları (µg/kg; µg/l).

Numuneler	Numune Kodu	Numune Alma Günleri						
		0	1	3	10	20	25	30
Serum	FFC-D1	11,01	*>46,00	*>46,00	*>46,00	202,86	14,96	15,07
	FFC-D2	10,17	*>46,00	*>46,00	*>46,00	57,16	10,20	23,41
	FFC-D3	8,54	*>46,00	*>46,00	*>46,00	135,59	10,81	20,41
	FFC-K1	5,1	8,93	8,61	8,93	9,1	8,81	18,6
Ağız Sıvısı	FFC-D1	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	143,52
	FFC-D2	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00
	FFC-D3	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	147,63
	FFC-K1	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00	*>46,00
Dışkı	FFC-D1	3,91	*>92,00	247,38	31,75	11,32	2,57	9,88
	FFC-D2	3,11	*>92,00	301,2	26,11	4,87	7,59	18,57
	FFC-D3	4,50	*>92,00	*>92,00	56,11	9,59	9,38	4,16
	FFC-K1	5,78	25,34	3,66	3,69	2,03	17,48	13,65

FFC: Florfenikol, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyon üzerinde.

Florfenikol karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilmiştir (Tablo 23).

Karaciğer örneklerinde 3 numaralı deney hayvanına ait değerin (>92,00 µg/kg) 3000 µg/kg olan maksimum kalıntı limitini aşma ihtimali olduğu belirlendi ve LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı (Tablo 23). LC-MS/MS ile tespit edilen konsantrasyonun (0,02 µg/kg) maksimum kalıntı limitini aşmadığı görüldü (Tablo 24). Böbrek ve kas örneklerinde deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin maksimum kalıntı limitini aşmadığı belirlendi (Tablo 23).

Tablo 23. Florfenikolün AM II ile karaciğer, böbrek ve kaslarda tespit edilen miktarları ve MRL değerleri (µg/kg).

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek		Kas	
	AM II	MRL	AM II	MRL	AM II	MRL
FFC-D1	51,28	3000	61,27	300	33,00	200
FFC-D2	55,22		49,83		39,55	
FFC-D3	*>92,00		55,36		48,04	
FFC-K1	32,38		5,71		4,13	

FFC: Florfenikol, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, MRL: Maksimum kalıntı limiti, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyonun üzerinde.

Tablo 24. Doğrulaması yapılan örneğin AM II ve LC-MS/MS miktarları (µg/kg).

Numune Kodu	Karaciğer	
	AM II	LC-MS/MS
FFC-D3	>92,00	0,02

FFC: Florfenikol, D: Deney hayvanı.

4.7. Penisilin G

Penisilin G serum örneklerinde tespit edilirken, ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde sağlıklı sonuçlar elde edilememiştir (Tablo 25).

Serum örneklerinde tespit edilen penisilin G değerleri 1. gün maksimum konsantrasyona ulaşmış, 3. gün itibariyle belirgin oranda azalmış ve 10. günün itibariyle 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 25). Ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde farklı günlerdeki deney grubuna ait değerlerin kontrol değerleriyle benzer olduğu görülmektedir (Tablo 25).

Tablo 25. Penisilin G'nin BLACT ile serum, ağız sıvısı ve dışkıda tespit edilen miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$; $\mu\text{g}/\text{l}$).

Numuneler	Numune Kodu	Numune Alma Günleri						
		0	1	3	10	30	50	60
Serum	PEN-D1	0,64	*>50,00	0,25	0,80	0,25	0,35	0,20
	PEN-D2	0,48	*>50,00	14,28	0,47	0,56	0,00	0,00
	PEN-D3	1,30	*>50,00	12,62	0,34	0,44	0,79	0,35
	PEN-K1	0,51	1,02	0,37	0,48	0,00	0,58	0,39
Ağız Sıvısı	PEN-D1	0,46	0,78	0,85	1,94	1,25	1,16	0,70
	PEN-D2	0,71	1,06	1,07	1,81	1,30	1,15	0,72
	PEN-D3	0,00	0,65	0,79	0,84	1,13	1,30	0,39
	PEN-K1	0,92	0,61	1,35	0,89	1,34	1,34	0,50
Dışkı	PEN-D1	1,82	1,36	1,83	1,04	1,46	1,76	0,66
	PEN-D2	2,68	1,35	2,42	1,04	1,34	1,34	0,58
	PEN-D3	1,81	1,83	1,62	2,28	1,17	1,37	1,59
	PEN-K1	1,13	2,71	1,16	2,71	1,47	1,52	1,51

PEN: Penisilin G, D: Deneysel hayvanı, K: Kontrol hayvanı, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyonun üzerinde.

Tablo 26. Penisilin G BLACT ile karaciğer, böbrek ve kaslarda tespit edilen miktarları ve MRL değerleri ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek		Kas	
	BLACT	MRL	BLACT	MRL	BLACT	MRL
PEN-D1	6,93	50	2,79	50	3,32	50
PEN-D2	21,39		21,42			
PEN-D3	1,03		0,38			
PEN-K1	2,25		2,18			

PEN: Penisilin G, D: Deneysel hayvanı, K: Kontrol hayvanı, MRL: Maksimum kalıntı limiti.

Penisilin G karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilmiştir (Tablo 26).

Karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin 50 µg/kg olan maksimum kalıntı limitini aşmadığı görülmektedir (Tablo 26).

4.8. Amoksisilin

Amoksisilin serum örneklerinde tespit edilirken, ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde sağlıklı sonuçlar elde edilememiştir (Tablo 27).

Serum örneklerinde tespit edilen amoksisilin değerleri 1. ve 3. gün maksimum konsantrasyonda seyrederken, 10. günde 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 27).

Ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde farklı günlerdeki deney grubuna ait değerlerin kontrol değerleriyle benzer olduğu görülmektedir (Tablo 27).

Tablo 27. Amoksisilin BLACT ile serum, ağız sıvısı ve dışkıda tespit edilen miktarları (µg/kg; µg/l).

Numuneler	Numune Kodu	Numune Alma Günleri					
		0	1	3	10	15	20
Serum	AMX-D1	7,76	*>60,00	*>60,00	6,93	10,66	8,69
	AMX-D2	6,29	*>60,00	*>60,00	5,78	10,02	7,08
	AMX-D3	6,71	*>60,00	172,03	8,03	9,81	13,85
	AMX-K1	8,83	7,20	6,22	5,20	10,63	12,68
Ağız Sıvısı	AMX-D1	6,51	8,24	7,46	7,32	9,14	6,42
	AMX-D2	7,17	6,44	6,75	7,86	7,75	3,53
	AMX-D3	5,92	6,39	3,22	7,31	6,14	4,19
	AMX-K1	6,03	7,75	7,05	6,08	4,44	6,85
Dışkı	AMX-D1	9,07	3,46	6,37	7,19	25,92	12,17
	AMX-D2	9,92	3,73	5,47	6,25	12,44	11,71
	AMX-D3	11,73	4,83	5,12	6,14	11,86	11,56
	AMX-K1	4,20	5,75	9,97	5,56	14,08	12,59

AMX: Amoksisilin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, (*): Tespit edilebilir maksimum konsantrasyonun üzerinde.

Amoksisilin karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilmiştir (Tablo 28).

Karaciğer ve böbrek örneklerinde deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin karaciğer ve böbrek için 50 µg/kg olan maksimum kalıntı limitini aşmadığı tespit edildi (Tablo 28).

Kas örneklerinde deney grubuna ait değerlerin maksimum kalıntı limitini aşmadığı görülürken, kontrol hayvanına ait değer (50,48 µg/kg) kas için 50 µg/kg olan maksimum kalıntı limitini aştığı tespit edildi ve LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı (Tablo 28). LC-MS/MS ile elde edilen konsantrasyonun (0,10 µg/kg) maksimum kalıntı limitini aşmadığı belirlendi (Tablo 29).

Tablo 28. Amoksisilin BLACT ile karaciğer, böbrek ve kaslarda tespit edilen miktarları ve MRL değerleri (µg/kg).

Numune Kodu	Karaciğer		Böbrek		Kas	
	BLACT	MRL	BLACT	MRL	BLACT	MRL
AMX-D1	23,10	50	10,24	50	13,21	50
AMX-D2	15,66		20,76		19,54	
AMX-D3	21,76		14,81		28,09	
AMX-K1	29,14		5,58		50,48	

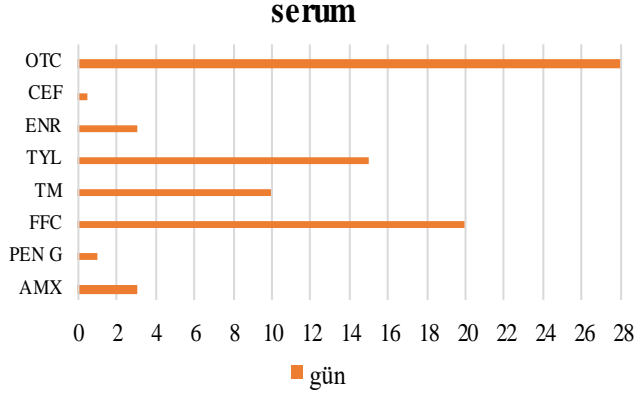
AMX: Amoksisilin, D: Deney hayvanı, K: Kontrol hayvanı, MRL: Maksimum kalıntı limiti.

Tablo 29. Doğrulaması yapılan örneğin BLACT ve LC-MS/MS miktarları (µg/kg).

Numune Kodu	Kas	
	BLACT	LC-MS/MS
AMX-K1	50,48	0,10

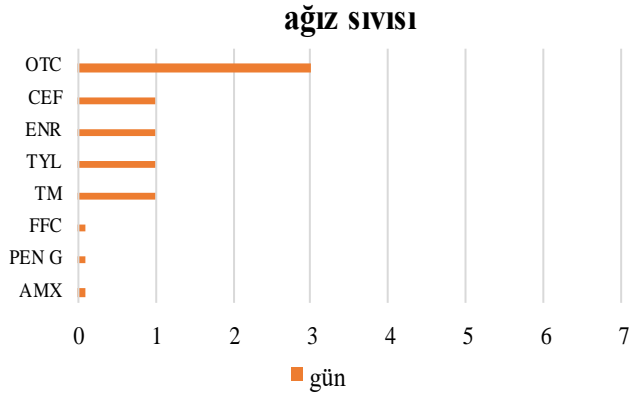
AMX: Amoksisilin, K: Kontrol hayvanı.

Çalışmada elde edilen analiz sonuçlarına göre serum örneklerinde seftiofur dışında çalışılan tüm antimikrobiyaller (oksitetrasiklin, enrofloksasin, tilosin, tilmikosin, florfenikol, penisilin G ve amoksisilin) Şekil 15'te gösterilen gün aralıklarında tespit edilebilmiştir.



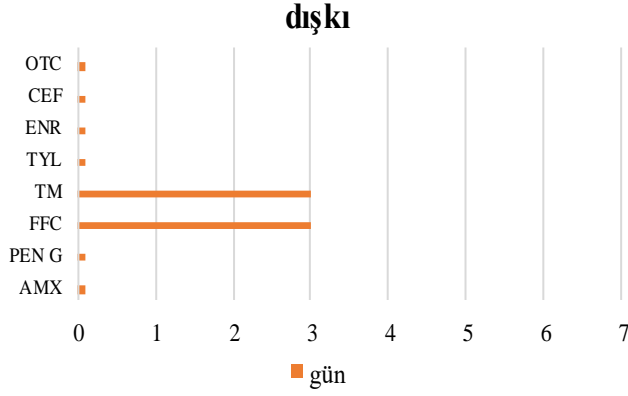
Şekil 15. Antibiyotiklerin serumda tespit edilme günleri.

Ağız sıvısı örneklerinde; oksitetrasiklin, seftiofur, enrofloksasin, tilosin ve tilmikosin belirlenebilirken; florfenikol, penisilin G ve amoksisilin tespit edilememiştir (Şekil 16). Oksitetrasiklin dışındaki tüm antimikrobiyaller ilaç uygulamasından sonraki ilk 24 saat içerisinde, oksitetrasiklin ise ilk 3 gün içinde tespit edilebilmiştir.



Şekil 16. Antibiyotiklerin ağız sıvısında tespit edilme günleri.

Dışkı örneklerinde, tilosin ve florfenikolün 1-3 gün arasında tespit edilebildiği; oksitetrasiklin, seftiofur, enrofloksasin, tilmikosin, penisilin G ve amoksisilin varlığının ise sağlıklı bir şekilde belirlenemediği ortaya konmuştur (Şekil 17).



Şekil 17. Antibiyotiklerin dışkıda tespit edilme günleri.

Yasal arınma süresi sonunda kesime gönderilen hayvanların karaciğer, böbrek ve kas örnekleri biochip array based immuonassay yöntemi ile analiz edildi. Doku örneklerinde seftiofur, enrofloksasin ve penisilin G sağlıklı bir şekilde tespit edilirken; oksitetrasiklin, tilosin, tilmikosin, florfenikol ve amoksisilin analizlerinde hatalı pozitiflikler görüldü.

Oksitetrasiklinin iki karaciğer, bir böbrek örneğinde yüksek pozitiflik tespit edildi. Bir karaciğer ve bir böbrek numunesinin LC-MS/MS ile yapılan doğrulaması sonucunda, sonuçların limitleri aşmadığı, AM II ile elde edilen sonuçların hatalı yüksek pozitiflik olduğu belirlendi.

Tilmikosinin 2 karaciğer örneğinde yüksek olduğu tespit edildi. Örneklerden birinin LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı ve sonucun maksimum kalıntı limitinin altında olduğu belirlendi. Florfenikolün 1 karaciğer numunesinde yüksek pozitifliklik gösterdiği tespit edildi. Yapılan LC-MS/MS analiziyle, sonucun limitlerin altında kaldığı görüldü.

Amoksisilinin, kontrol hayvanına ait kas örneğinde kalıntı limitlerine çok yakın konsantrasyonlarda olduğu tespit edildi ve LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı. AM II ile elde edilen sonucun hatalı yüksek pozitiflikten kaynaklandığı belirlendi.

Tilosin, üç karaciğer ve üç böbrek örneğinde yüksek konsantrasyonlarda tespit edildi. LC-MS/MS ile yapılan doğrulama sonucunda, iki karaciğer ve bir böbrek örneğinin maksimum kalıntı limitini aştığı ortaya kondu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sahada sıklıkla kullanılan ilaçların, özellikle de antimikrobiyallerin gıda değeri olan dokularda oluşturduğu kalıntı riski halk sağlığı bakımından oldukça önemlidir. Yapılan kalıntı çalışmaların pek çoğu kesim sonrası örnekler üzerinden yürütülmektedir. Ancak kalıntı varlığının kesim öncesinde tespit edilebilmesi, sürecin tüketici lehine yönetilebilir hale getirilmesini, gıda güvenliği, halk sağlığı ve ihracat için önemli bir güven ortamı oluşmasını sağlayacaktır. Bu nedenle besi hayvanlarında kullanılan ilaç ve/veya onların metabolitlerinin kesim öncesi ve kesim sonrası örneklerde tespitine yönelik hızlı ve ekonomik yöntemlere ihtiyaç vardır. Çalışmada kullanılan biochip array tekniği antimikrobiyallerin analizinde kullanılan AM II ve BLACT gibi kitleri bulunan bir tarama testidir. Bu teknikle elde edilen şüpheli sonuçların doğrulama metoduyla kontrolünün yapılması gerekir. Bu nedenle çalışma kapsamında şüpheli görülen sonuçların mümkün olduğunca LC-MS/MS ile doğrulaması yapılmıştır. Bu çalışma hem kesim öncesi hem kesim sonrası örneklerde eş zamanlı olarak antimikrobiyal kalıntı varlığını araştıran öncü çalışmalardan biridir. Bu nedenle ileriki dönemlerde eksik yönleri geliştirilerek çalışmanın derinleştirilmesi ve LC-MS/MS ile paralel çalışılarak sonuçların doğrulanması önerilmektedir.

Bu bölümde besi hayvanlarına tedavi dozunda uygulanan oksitetrasiklin, seftiofur, enrofloksasin, tilosin, tilmikosin, amoksisilin, penisilin G ve florfenikolün kesim öncesi ağız sıvısı, dışkı ve serum; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde kalıntı varlığının tespit edilip edilemediği, tespit edebilme durumunda ise hangi örneklerde sağlıklı sonuçlar alındığı belirlenmiştir. Ayrıca yasal arınma süresi sonunda alınan karaciğer, böbrek ve kas örneklerindeki kalıntı düzeyleri incelenerek, prospektüste belirtilen yasal arınma süreleri ile uyumu değerlendirilmiştir.

5.1. Oksitetrasiklin

Tetrasiklinlerin memelilerde vücut geneline iyi dağıldığı bilinmektedir. Landoni ve Errecalde (1992) oksitetrasiklinin, yüksek dağılım hacmine (Vd) sahip lipofilik bir ilaç olduğunu, yaptıkları çalışmada sığırlara kas içi yolla tek doz 20 µg/kg/ca oksitetrasiklin uygulaması sonrası alınan çeşitli örneklerde yüksek konsantrasyonlarda oksitetrasiklin tespit ettiklerini bildirmiştir.

Çalışmada uzun etkili oksitetrasiklin preperatı, 3 gün arayla 2 doz olarak (20 µg/kg/ca) kas içi yolla uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, oksitetrasiklinin sığırların kesim öncesi serum ve ağız sıvısı; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde AM II tekniği ile tespit edilebildiği görülmüştür. Dışkı örneklerinde ise bu yöntem güvenilir ve sağlıklı gözükmemektedir (Tablo 9).

Serum

Yapılan çalışmalara göre oksitetrasiklinin 0,5-1 µg/ml serum seviyesi etkin konsantrasyon olarak tanımlanmıştır (Brandt ve Pugh, 1977; Luthman ve Jacobsson 1982). Toutain ve Raynaud (1983), uzun etkili oksitetrasiklin preperatının tek doz olarak (20 µg/kg/ca) kas içi yolla uygulanmasının ardından serumdaki oksitetrasiklinin 60 dk içinde 2,3 µg/ml konsantrasyona ulaştığını bildirmiştir. Oksitetrasiklinin 12 saat boyunca 4 µg/ml üzerinde seyrettiğini, sonrasında kademeli şekilde azalmaya başladığını ortaya koymuştur. 72 saat sonunda hala 0,5 µg/ml üzerinde olduğunu belirtmiştir. Buna paralel olarak Landoni ve Errecalde (1992) sığırlara kas içi yolla tek doz 20 µg/kg oksitetrasiklin uygulaması sonrası 72. saatte alınan serum örneklerinde 0,81 µg/ml oksitetrasiklin tespit etmiştir. Fourtillan ve Dubourg (1982) sığırlarda 70 saat, Nouws (1982) ise, buzağılarda 60 saat boyunca oksitetrasiklinin etkin konsantrasyonların üzerinde olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada ise AM II sonuçlarına göre uzun etkili oksitetrasiklinin serum örneklerinde 1, 3 ve 10. günlerde maksimum konsantrasyonda olduğu tespit edildi (Tablo 9). 20. gün itibariyle periyodik olarak azalmakla birlikte 28. gün sonunda dahi kontrol değerlerinin yaklaşık 7-12 kat üzerinde seyrettiği görüldü. 28. gün sonunda, 1 ve 2 numaralı deney hayvanında oksitetrasiklinin etkin konsantrasyonlarda (0,765 µg/ml; 0,748 µg/ml), 3 numaralı deney hayvanında ise (0,423 µg/ml) bu konsantrasyonlara

çok yakın olduğu belirlendi. Bu çalışmada elde edilen uzun süreli etkin derişimlerin temel nedeni 3 gün arayla 2 doz oksitetrasiklin uygulanmasına bağlanabilir.

Oksitetrasiklinin serum örneklerinde 1-10 gün arasında AM II yöntemi ile net bir şekilde tespit edilebildiği, 28. güne kadar bu pozitifliğin belirli oranda devam ettiği belirlendi (Tablo 9 ve Şekil 15). Serumda, 28. günlük yasal arınma süresi sonunda tespit edilen yüksek konsantrasyonların, dokularda kalıntı limitini aşmaya neden olmadığı ortaya kondu (Tablo 10 ve Tablo 11).

Ağız sıvısı

Oruç ve diğerleri (2013), tetrasiklin içeren yemlerle beslenen domuzların ağız sıvısında biochip array tekniği ile tetrasiklinleri tespit ettiklerini ve bu yöntemin domuz ağız sıvılarında tetrasiklin tespiti için kullanılabileceğini bildirmiştir. Meiszberg ve diğerleri (2011) ise kas içi yolla uygulanan oksitetrasiklini domuz ağız sıvısında pen-side competitive ELISA yöntemi ile tespit etmiştir.

Oksitetrasiklinin sığır ağız sıvısına geçip geçmediğiyle ilgili fazla çalışmaya rastlanmasa da Landoni ve Errecalde (1992) sığırlara kas içi yolla tek doz 20 µg/kg oksitetrasiklin uygulaması sonrası 72. saatte alınan ağız sıvısında 0,24 µg/ml oksitetrasiklin tespit etmiştir. Bu çalışmada ise uzun etkili oksitetrasiklinin AM II yöntemi ile sığır ağız sıvısında tespit edilebildiği görülmüştür. AM II ile elde edilen sonuçlara göre, oksitetrasiklinin ağız sıvısı örneklerindeki konsantrasyonunun, 1. gün pik yaptığı, 3. gün belirgin şekilde azaldığı ve 20. gün itibariyle 0. gün ve kontrol değerlerine indiği belirlenmiştir (Tablo 9).

Oruç ve diğerleri (2013), biochip array tekniği ile tetrasiklinin ağız sıvısındaki analizi için recovery oranını %42 olarak belirlemişlerdir. Bu değer, çalışmada tespit edilen recovery değeri (%33) ile genel olarak uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmada, oksitetrasiklinin ağız sıvısı örneklerinde son ilaç uygulamasından sonra 1 gün içerisinde AM II yöntemi ile net bir şekilde belirlenebildiği, 3. güne kadar pozitifliğin devam ettiği ve büyük oranda tespit edilebildiği görüldü (Tablo 9 ve Şekil 16).

Dışkı

Oksitetrasiklinin % 85-96'sı idrarla, küçük bir kısmı da dışkı ile atılmaktadır (Nouws ve diğerleri, 1985). Dışkı ile atılan kısım, idrarla atılan kısmın yaklaşık % 2'sini oluşturmaktadır (Nouws ve Ziv, 1978a). AM II ile elde edilen sonuçlara göre 0. gün ve kontrol değerlerinin yüksek pozitiflik vermesi bu yöntemle oksitetrasiklinin dışkı örneklerinde sağlıklı bir şekilde analizinin mümkün olmadığını göstermektedir (Tablo 9 ve Şekil 17). Dışkı ile düşük atılım oranına sahip olmasına rağmen, hem deney hem de kontrol hayvanlarında yüksek pozitifliklerin bulunması, matriksin veya uygulanan ekstraksiyon metodunun bu yöntem için uygun olmadığını göstermektedir. Ayrıca kalıntı varlığının bu yöntemle sağlıklı bir şekilde tespit edilemeyeceği düşük geri kazanım oranı (%1) ile de ortaya konmuştur (Tablo 7).

Dokular

Yasal arınma süresi sonunda kesime gönderilen hayvanların dokularında oksitetrasiklinin genel olarak sağlıklı bir şekilde tespit edilebildiği görülmektedir. AM II sonuçlarına göre karaciğer ve böbrek örneklerindeki oksitetrasiklin konsantrasyonunun kaslardaki miktardan daha yüksek olduğu ortaya konmuştur (Tablo 10). Landoni ve Errecalde (1992) yaptıkları çalışmada sığırlara kas içi yolla tek doz 20 µg/kg oksitetrasiklin uygulaması sonrası 72. saatte alınan böbrek örneklerinde $4,43 \pm 1,13$ µg/g; karaciğer örneklerinde $3,29 \pm 1,25$ µg/g; kas örneklerinde ise $0,70 \pm 0,14$ µg/g oksitetrasiklin tespit etmiştir. Landoni ve Errecalde (1992), sığırlara kas içi yolla oksitetrasiklin uygulanmasından sonra kaslardaki oksitetrasiklin miktarının karaciğer ve böbreklerdeki miktarlardan düşük olmasını oksitetrasiklinin temel atılım yolunun idrar ve safra olmasıyla ilişkilendirmiştir.

Bu çalışmada ise 1 ve 3 numaralı deney hayvanına ait karaciğer ve 3 numaralı deney hayvanına ait böbrek numunesinde oksitetrasiklin miktarı $>57,60$ µg/kg olarak tespit edildi (Tablo 10). Kas örneklerinde ise tüm sonuçların maksimum kalıntı limitinin altında olduğu belirlendi (Tablo 10). Bu kapsamda 3 numaralı deney hayvanına ait karaciğer ve böbrek örneklerinin maksimum kalıntı limitini aşma ihtimali nedeniyle LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı. Karaciğer ve böbrek örneklerine ait LC-MS/MS sonuçları sırasıyla $24,29$ µg/kg ve $4,53$ µg/kg olarak

tespit edildi ve maksimum kalıntı limitlerini aşmadığı belirlendi (Tablo 11). Çalışmada elde edilen AM II sonuçları ile prospektüste belirtilen 28 günlük yasal arınma süresinin uyumlu ve yeterli olduğu görüldü.

Nouws ve diğerleri (1985), oksitetrasiklin atılımının yaklaşık %90'ının böbrekler aracılığıyla olduğunu ve eliminasyonun renal klirens, glomeruler filtrasyon hızı ve idrar miktarı ile doğrudan ilişkili olduğunu bildirmiştir. Hasta hayvanların karaciğer ve böbreklerinde, sağlıklı hayvanlara göre 2 ile 3 kat daha fazla oksitetrasiklin tespit edilmiştir (Nouws ve Ziv, 1978a). Kalıntı varlığı değerlendirilirken, eliminasyonunda böylesine önemli rol oynayan bir organın hasarı ya da sistemik olarak var olan bir hastalık durumu oksitetrasiklin metabolizmasını ve atılım hızını dolayısıyla ilacın vücutta kalış süresini değiştirebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

5.2. Seftiofur

Yapılan farmakokinetik çalışmalarda, seftiofurun doza ve hayvan türüne göre farklılık göstermekle beraber uygulandığı bölgeden hızlıca emildiği, yüksek oranda plazma proteinlerine bağlandığı (%89-91), vücutta sıvı kompartmanlara yaygın olarak dağıldığı ve böbrekten yavaş atıldığı gösterilmiştir (Altan, 2013).

Desfuroylseftiofur, seftiofurun ana metabolitidir ve aynı zamanda farmakolojik olarak da aktif bir bileşiktir (Beconi-Barker ve diğerleri, 1995; Salmon ve diğerleri, 1996). Seftiofur, yapısında bulunan tiyoester bağlarının esterazlar tarafından hidrolize edilmesiyle bir tiyoesteraz hidroliz ürünü olan desfuroylseftiofura dönüştürülür (Krzeminski ve diğerleri, 1985; Yein ve diğerleri, 1990; Banting ve diğerleri, 1989; Li, Zheng, Machesky, Yates ve Katterhenry, 2011; Radford ve diğerleri, 2018). Bu dönüşüm böbrek ve karaciğerde aktif olarak gerçekleşirken kas ve akciğerlerde pek de aktif değildir (Olson ve diğerleri, 1998). Farmakokinetik çalışmaları 1 mg/kg/ca dozda, kas içi yolla uygulanan seftiofurun 24 saat içinde %95'den fazlasının vücuttan atıldığını, bunun yaklaşık %60-80'inin idrar yoluyla gerçekleştiğini ve atılan formun çoğunluğunun desfuroylseftiofur olduğunu göstermektedir (Kaya, 2000; Brown, Jaglan ve Banting, 1991; Jaglan, Kubicek, Arnold ve Cox, 1989; EMEA, 1999a). Avrupa ilaç değerlendirme ajansı (EMA)

tarafından sunulan rapora göre ilaç uygulamasından 2-4 saat sonra kanda metabolize edilmemiş seftiofura rastlanmadığı bildirilmiştir (EMEA, 1999a). Türk Gıda Kodeksi (2017), "Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği"nde, seftiofur için belirleyici kalıntı türü olarak desfuoylseftiofur tanımlanmıştır (Tablo 8). Bu nedenle, çalışma kapsamında AM II ile elde edilen sonuçlar desfuoylseftiofur üzerinden hesaplanmıştır.

Çalışmada seftiofur, 1 mg/kg dozda, günde 1 defa, 5 gün boyunca, kas içi yolla uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, desfuoylseftiofurun sığırların kesim öncesi ağız sıvısı; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde AM II tekniği ile tespit edilebildiği, serum ve dışkı örneklerinde ise sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği belirlenmiştir (Tablo 12).

Serum

Brown ve diğerleri (1991), 1 mg/kg/ca dozda seftiofur uygulamasından 1 saat sonra sığır serumlarında tespit edilebilir düzeyde seftiofur bulunmamasına rağmen uygulamadan 1 saat sonra 3,75-0,44 g/ml düzeyinde desfuoylseftiofur tespit ettiklerini bildirmiştir. Bu çalışmada ise AM II sonuçlarına göre, son ilaç uygulamasından 24 saat sonra alınan (1. gün) serum örneklerinde desfuoylseftiofur konsantrasyonunda kısmi bir yüksekliğin olduğu, 7. gün itibariyle 0. gün ve kontrol seviyelerine yaklaştığı görüldü (Tablo 12).

Çalışmada, serum örneklerinde 0 ve 1. günler arasında desfuoylseftiofur konsantrasyonlarında yükselme görülse de, tespit edilen geri kazanım oranı %1290 (Tablo 7), bu yöntemin sığır serum örneklerinde desfuoylseftiofur için yüksek duyarlılığa sahip olduğunu ve analizinin sağlıklı olmadığını göstermiştir.

Ağız Sıvısı

AM II ile elde edilen sonuçlara göre, ağız sıvısında tespit edilen desfuoylseftiofur miktarı 1. gün kısmi olarak yükselmiş, 3. gün itibariyle kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 12). Meiszberg ve diğerleri (2011) domuzlara 4,3 mg/kg dozda kas içi yolla uygulanan seftiofurun domuz ağız sıvısında pen-side competitive

ELISA yöntemi ile tespit etmiştir. Oruç ve diğerlerinin (2013), domuz ağız sıvısında biochip array tekniği ile yaptıkları çalışmada seftiofurun recovery oranı %212 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ise sığır ağız sıvısında AM II ile tespit edilen seftiofura ait recovery oranı %135 olarak elde edilmiştir (Tablo 7).

Çalışmada, desfuoylseftiofurun ağız sıvısı örneklerinde 0-1. günler arasında düşük miktarlarda da olsa AM II yöntemi ile tespit edilebildiği görülmektedir (Tablo 12 ve Şekil 16).

Dışkı

Seftiofurun yaklaşık %60-80'inin idrarla, kalan kısmın ise dışkı ile atıldığı bilinmektedir (Kaya, 2000; Brown ve diğerleri, 1991; Jaglan ve diğerleri, 1989; EMEA, 1999a). AM II sonuçlarına göre, desfuoylseftiofurun dışkı örneklerinde 0-1. günler arasında maksimum konsantrasyonlara ulaştığı, 3. gün itibariyle azalarak kontrol değerlerine indiği görülmektedir (Tablo 12). Dışkı ile sınırlı atılım oranına sahip olmasına rağmen, 0. gün dahil hem deney hem de kontrol hayvanlarında yüksek pozitifliklerin bulunması, matriksin veya uygulanan ekstraksiyon metodunun bu yöntem için uygun olmadığını göstermektedir. Ayrıca kalıntı varlığının bu yöntemle sağlıklı bir şekilde tespit edilemeyeceği düşük geri kazanım oranı (%9) ile de ortaya konmuştur (Tablo 7).

Çalışmada, desfuoylseftiofurun dışkı örneklerinde AM II yöntemi ile sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği belirlenmiştir.

Dokular

Yasal arınma süresi sonunda kesime gönderilen hayvanların dokularında desfuoylseftiofurun sağlıklı bir şekilde tespit edilebildiği görüldü (Tablo 13). Çalışmada deney ve kontrol grubu hayvanlarına ait tüm doku örneklerinde tespit edilen miktarların maksimum kalıntı limitlerini aşmadığı belirlendi (Tablo 13).

AM II sonuçlarına göre karaciğer ve böbrek örneklerindeki desfuoylseftiofur konsantrasyonunun kaslardaki miktardan daha yüksek olduğu görüldü (Tablo 13). Buna paralel olarak, sığırlara 2,2 mg/kg/ca dozda, 5 gün boyunca, kas içi yolla

seftiofur uygulanan bir çalışmada, son ilaç uygulamasından 8 saat sonra böbrekte 5540 µg/kg, karaciğerde 1350 µg/kg, kasta 230 µg/kg konsantrasyonda seftiofur tespit edilmiştir (EMA, 1999a). Yine sığırlara 2,2 mg/kg/ca dozda, 3 gün boyunca, kas içi yolla seftiofur uygulanan bir başka çalışmada, son ilaç uygulamasından 3 gün sonra böbrekte 953 µg/kg, karaciğerde 250 µg/kg, kasta 37 µg/kg konsantrasyonda seftiofur ölçülmüştür (EMA, 1999a). Koyunlarda yapılan çalışmada ise 2,2 mg/kg/ca dozda 5 gün boyunca kas içi yolla uygulanan seftiofur sonrasında en yüksek oranlar sırasıyla böbrek (%95,7) ve karaciğerde (%90,5) bulunmuştur (Beconi-Barker ve diğerleri, 1995). AM II ile elde edilen sonuçlar ve mevcut çalışmalar, desfuoylseftiofurun karaciğer ve böbrek örneklerindeki konsantrasyonunun kaslardaki miktardan daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum, seftiofurun desfuoylseftiofura dönüştürülmesinde rol oynayan esterazların böbrek ve karaciğerde aktif olarak bulunurken kasta aktif olarak bulunmamasıyla yorumlanabilir (Olson ve diğerleri, 1998).

Lin, Vahl ve Riviere (2016), böbrek hasarı bulunan sığır ve domuzlardan aldıkları plazma, karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilen desfuoylseftiofur miktarının, sağlıklı hayvanlara göre eser miktarda değiştiğini ya da hiç değişmediğini bildirilmiştir.

Çalışmada elde edilen AM II sonuçları ile seftiofur için prospektüste belirtilen 7 günlük yasal arınma süresinin uyumlu ve yeterli olduğu görülmüştür.

5.3. Enrofloksasin

Enrofloksasinin parenteral yolla uygulandığında iyi emilim gösterdiği, eklem sıvısı ve prostat da dahil tüm vücut kısımlarına iyi dağıldığı bilinmektedir (Stein, 1991; Walker, Stein, Hauptman ve Macdonald, 1992; Küng, 1993; Parlar ve Kaya, 2005). Enrofloksasin, proteinlere düşük oranda (<%50) bağlanır (Kabadayı, 2014). Karaciğerde gerçekleşen deetilasyon sonucu ana metaboliti olan siprofloksasine ve diğer alt metabolitlerine dönüşerek, başlıca idrar ve safra yoluyla atılır (EMA, 1998; Parlar ve Kaya, 2005; Kabadayı, 2014). Hayvan türüne göre farklılık gösterse de çoğu türde enrofloksasin metabolize olarak, önemli oranda ana metaboliti olan siprofloksasine dönüşmektedir (Davis, Foster ve Papich, 2008; Idowu, Peggins, Cullison ve von Bredow, 2010; Troughon ve Lefebvre, 2016).

Sığırlara deri altı yolla enrofloksasin uygulanmasından sonra plazmada tespit edilen siprofloksasin düzeyinin, toplam ilaç miktarına oranının (enrofloksasin+siprofloksasin) yaklaşık olarak %32 ile %41 arasında olduğu (McKellar, Gibson, Monteiro ve Bregante, 1999; Davis ve diğerleri, 2008; Lucas, San Andrés, González, Froyman ve Rodríguez, 2008); damar içi yolla enrofloksasin uygulaması sonrasında ise bu miktarın %59 ile %64 arasında değiştiği bildirilmektedir (Idowu ve diğerleri, 2010).

Sığırlara 5 mg/kg dozda, deri altı yolla, 5 gün süreyle uygulanan enrofloksasinin son doz uygulamasından 8 saat sonra kesilen bir dana ve bir düvenin karaciğer, böbrek ve kasında enrofloksasin ve siprofloksasin analizi yapılmıştır. Enrofloksasinin toplam kalıntıdağı oranı iki hayvanın karaciğerinde sırasıyla, %21 ile %26; böbreğinde %27 ile %31 ve kasında %55 ile %56 olarak bulunmuştur (EMEA, 1998). Aynı dokularda siprofloksasinin toplam kalıntıya oranı karaciğerde %38 ile %44; böbrekte %50 ile %55 ve kasta %33 ile %34 olarak tespit edilmiştir (EMEA, 1998). Enrofloksasinin sığırlara 12,5 mg/kg dozda, deri altı yolla uygulanması sonrası kaslarda tespit edilen siprofloksasinin, enrofloksasin konsantrasyonunu aştığı bildirilmiştir (Davis ve diğerleri, 2008).

Türk Gıda Kodeksi (2017), Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliğinde, enrofloksasin için belirleyici kalıntı türü enrofloksasin ve siprofloksasin toplamı olarak tanımlanmıştır (Tablo 8). Ancak biochip array yönteminin aynı antimikrobiyal grup içindeki tek bir moleküle odaklanıp ölçüm yapması nedeniyle, doku örneklerinde elde edilen sonuçlar hem cross-reaktivite değeri (Tablo 8), hem de dokularda enrofloksasine göre daha yüksek konsantrasyonda bulunması nedeniyle (Davis ve diğerleri, 2008; EMEA, 1998) siprofloksasin üzerinden hesaplanmıştır.

Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmada AM II ile elde edilen kesim öncesi sonuçlar enrofloksasin üzerinden değerlendirilirken, kesim sonrası sonuçlar siprofloksasin üzerinden değerlendirilmiştir.

Çalışmada enrofloksasin, 5 mg/kg dozda, günde 1 defa ve 5 gün boyunca, kas içi yolla uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, enrofloksasinin sığırların kesim

öncesi serum, ağız sıvısı; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde AM II tekniği ile tespit edilebildiği, dışkı örneklerinde ise sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği belirlenmiştir (Tablo 14).

Serum

McKellar ve diğerleri (1999), sığırlara, deri altı yolla, tek doz olarak, 2,5 mg/kg; Lucas ve diğerleri (2008), yine sığırlara, deri altı yolla, tek doz olarak, 5 mg/kg dozda enrofloksasin uygulamıştır. Enrofloksasinin plazmada maksimum konsantrasyona ulaşma süresinin yaklaşık olarak sırasıyla $1,75 \pm 1,04$ ile $1,21 \pm 0,52$ saat arasında olduğu görülmektedir. Yine sığırlara deri altı yolla, tek doz (2,5 mg/kg) uygulanan enrofloksasinin 24. saat itibariyle ölçülen plazma konsantrasyonunun $0,1 \mu\text{g/ml}$ 'nin altında seyrettiği bildirilmiştir (McKellar ve diğerleri, 1999). Bu çalışmada ise, son ilaç uygulamasından 24 saat sonra (1. gün) alınan serum örneklerinde enrofloksasin miktarı $0,128 \mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir (Tablo 14). Burada tespit edilen konsantrasyonun daha yüksek olmasının en önemli nedeni, enrofloksasinin 5 mg/kg dozda, 5 gün boyunca uygulanmış olmasıdır.

AM II ile elde edilen sonuçlara göre, serum örneklerindeki enrofloksasin konsantrasyonunun 1. günde yükseldiği, 3. gün itibariyle düşmeye başladığı ve 15. günün sonunda 0. gün ve kontrol değerlerine indiği belirlenmiştir (Tablo 14). Ayrıca, 1 numaralı deney hayvanının 10. gün sonucu ($20,00 \mu\text{g/kg}$), aynı güne ait diğer sonuçlara ($0,00 \mu\text{g/kg}$) ve 3. gün kendi sonucuna göre ($11,74 \mu\text{g/kg}$) yüksek tespit edilmiştir (Tablo 14). Serum numunelerindeki AM II sonuçlarında bireysel olarak kısmi iniş çıkışların olabileceği ancak bu durumun, sonuçlarda şüphe yaratacak kadar ciddi oranda olmadığı görülmüştür. Tespit edilen geri kazanım oranı %400'dür (Tablo 7). Bu durum, serum örneklerinde enrofloksasin analizinde göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmada, enrofloksasinin serum örneklerinde 0. ve 3. günler arasında AM II yöntemi ile tespit edilebildiği görüldü (Tablo 14 ve Şekil 15).

Ağız Sıvısı

AM II ile ağız sıvısında tespit edilen enrofloksasin miktarı 1. gün yükseldiği, 3. gün itibariyle azalmaya başladığı, 10. günde 0. gün ve kontrol değerlerine yaklaştığı tespit edilmiştir (Tablo 14). Enrofloksasinin ağız sıvısına geçip geçmediği ile ilgili literatüre rastlanmasa da, florokinolonlar, yüksek dağılım hacmine ve yüksek biyoyararlanıma sahiptir (Kaartinen, Salonen, Alli ve Pyorala, 1995; Rao ve diğerleri, 2002). Eklem sıvısı, bronşiyal sıvılar ve prostat sıvısı gibi pek çok vücut kesimine nüfuz ettiği bilinmektedir (Stein, 1991; Walker ve diğerleri, 1992; Küng, 1993; Kaya, 1994; McKellar ve diğerleri, 1999). Dağılım özelliği, elde ettiğimiz AM II sonuçları ve tespit edilen geri kazanım oranı (%188) değerlendirildiğinde (Tablo 7), sığır ağız sıvısında enrofloksasin analizinin mümkün olduğu, ancak çalışmaların detaylandırılması gerektiği görülmektedir.

Çalışmada, enrofloksasinin ağız sıvısı örneklerinde 0-1. günler arasında AM II yöntemi ile tespit edilebildiği görünmektedir (Tablo 14 ve Şekil 16).

Dışkı

Enrofloksasin ve metabolitlerinin çoğu, böbreklerdeki glomeruler filtrasyon ve tubuler sekresyonla idrarla, nispeten daha az miktarda dışkı ile atılır (Boothe, 1994; Brown, 1996; McKellar, 1996; Bregante ve diğerleri, 1999).

AM II ile dışkı örneklerinde tespit edilen enrofloksasin miktarı 1. gün maksimum konsantrasyona ulaşmış, 10. gün itibariyle azalmaya başlamış ve 15. gün sonunda hala 0. gün ve kontrol değerlerinin üzerinde seyretmiştir (Tablo 14). Dışkı örneklerinde ilaç uygulamasından sonraki günlerde kontrol sonuçlarının yüksekliği dikkat çekmektedir. Enrofloksasinin temel atılım yolunun dışkı olmaması, kontrol sonuçlarında elde edilen yüksek pozitiflik ve tespit edilen düşük recovery oranı (%4) nedeniyle, AM II yöntemi ile enrofloksasinin dışkı örneklerinde analizi sağlıklı ve mümkün görünmemektedir.

Dokular

Yasal arınma süresi sonunda kesime gönderilen hayvanların karaciğerinde siprofloksasinin tespit edilebildiği, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilemediği belirlendi (Tablo 15). Karaciğer örneklerinde pozitiflik tespit edilirken, böbrek ve kas örneklerinde pozitifliğe rastlanmaması, enrofloksasinin böbrek ve kasta tespit edilebilir konsantrasyonların altında bulunmasıyla ilişkilendirilebilir. Çalışmada deney ve kontrol grubu hayvanlarına ait tüm doku örneklerinde tespit edilen siprofloksasin miktarlarının maksimum kalıntı limitlerini aşmadığı belirlendi (Tablo 15). Enrofloksasine ait cross-reaktivite değeri (%76) göz önüne alınarak, enrofloksasin ve siprofloksasin toplamı hesap edilse dahi elde edilen sonucun kalıntı limitlerini aşmayacağı görülmektedir (Tablo 5 ve Tablo 7).

Sığırlara 5 gün boyunca, 5 mg/kg dozda, deri altı yolla enrofloksasin enjekte edilen bir çalışmada, karaciğer, böbrek ve kastaki toplam kalıntı konsantrasyonlarının, uygulamadan 8 saat sonra sırasıyla 10,05; 7,47 ve 1,54 µg/kg ölçüldüğü, bu değerlerin de 14 gün sonunda sırasıyla 639, 66 ve 4 µg/kg'a düştüğü bildirilmektedir (EMEA, 1998). Sığırlarda enrofloksasinin son doz uygulamasından 3 gün sonra kas, karaciğer ve böbrekte tespit edilen kalıntı konsantrasyonlarının 1:3:2 oranında olduğu gösterilmiştir (EMEA, 1998). Buna karşı AM II ile elde edilen sonuçlarda böyle bir oransal bağlantıya rastlanmamıştır (Tablo 15).

Lin ve diğerleri (2016), hasta sığırlardan aldıkları plazma, karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilen siprofloksasin miktarının, sağlıklı hayvanlarda tespit edilen miktarlar ile farklılık göstermediğini bildirmişlerdir. Hwang ve diğerleri (2009) ise ratlarda yaptıkları çalışmada karaciğer yetmezliğinin, enrofloksasin farmakokinetiği üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını, böbrek yetmezliğinin ise belirgin şekilde eliminasyon yarı ömrünü uzattığını belirtmiştir. Kalıntı varlığı değerlendirilirken bu durum da göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmada elde edilen AM II sonuçları ile enrofloksasinin dokularda özellikle karaciğerde genel olarak sağlıklı bir şekilde analiz edilebileceği ve prospektüste belirtilen 14 günlük yasal arınma süresinin uyumlu ve yeterli olduğu görülmüştür.

5.4. Tilosin

Tilosin, yüksek oranda yağda çözünür, vücut sıvılarına ve dokularına yaygın olarak dağılır (Burrows, 1980). Plazma proteinlerine % 25–47 oranında bağlanır (Nouws ve Ziv, 1977; Avcı ve Elmas, 2014). Formüle edilmiş tilosin temel olarak (%80-90) tilosin A'dan ve küçük miktarlarda tilosin B, C ve D'den oluşur (Kanfer, Skinner ve Walker, 1998; Loke, Ingerslev, Halling-Sorensen ve Tjornelund, 2000; Teeter ve Meyerhoff, 2003). Başlıca safra ve sütle, kısmen de idrarla atılır (Botsoglou ve Fletouris, 2001; Avcı ve Elmas, 2014).

Sığırlara 17,6 mg/kg dozda, günde 1 defa, 3 gün boyunca, kas içi yolla tilosin uygulamasından 4 saat sonra alınan karaciğer, böbrek, kas ve dışkıda bulunan ana kalıntının tilosin A olduğu bildirilmektedir (JECFA, 2009).

Türk Gıda Kodeksi (2017), "Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği"nde, tilosin için belirleyici kalıntı türü "Tilosin A" olarak tanımlanmıştır (Tablo 8). Bu bilgiler doğrultusunda kesim öncesi ve sonrası örneklerde kalıntı analizinin tilosin A üzerinden yürütülmesi sağlıklı olacaktır. Ancak biochip array yönteminin aynı antimikrobiyal grup içindeki tek bir moleküle odaklanıp ölçmesi ve tilosin A için cross-reaktivite değerinin tanımlanmamış olması nedeniyle, kesim öncesi ve sonrası AM II sonuçları tilosin ana molekülü üzerinden değerlendirilmiştir.

Çalışmada tilosin, 10 mg/kg dozda, günde 1 defa, 5 gün boyunca, kas içi yolla uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, tilosinin sığırların kesim öncesi serum, ağız sıvısı ve dışkı; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde AM II tekniği ile tespit edilebildiği belirlenmiştir (Tablo 16).

Serum

Sığırlara 17,5 mg/kg dozda, kas içi yolla uygulanan tilosinin yaklaşık 2 saat içinde pik konsantrasyona ulaştığı (van Duyn and Folkerts, 1979; Avcı ve Elmas, 2014), yarılanma ömrünün $20,46 \pm 2,08$ saat olduğu ve tek doz ilaç uygulanmasından sonra 48 saate kadar serumda tespit edildiği bildirilmiştir (Avcı ve Elmas, 2014).

AM II sonuçlarına göre ise, serumda tespit edilen tilosin değerlerinin 1. ve 3. günlerde maksimum konsantrasyonda seyrettiği görülmektedir (Tablo 16).

Nouws ve Ziv (1977), sığırlara 7.3 mg/kg dozda tilosinin kas içi yolla, tek doz olarak uygulanmasından 24 saat sonra plazmadaki tilosin konsantrasyonunu <0.4 µg/ml olarak tespit etmiştir. AM II sonuçlarına göre, son ilaç uygulamasından 24 saat sonra serumda tespit edilen tilosin sonucu yüksek pozitiflik (>43,50 µg/l) göstermiştir (Tablo 16). 3. gün sonuçlarına göre ise 1 ve 2 numaralı deney hayvanı yine yüksek pozitiflik (>43,50 µg/l) gösterirken, 3 numaralı deney hayvanına ait tilosin konsantrasyonu 205 µg/l olarak belirlenmiştir. Nouws ve Ziv (1977), tek doz tilosin uygulaması sonrası 24. saatte 0,4 µg/ml'den düşük tilosin konsantrasyonu tespit ederken, AM II ile tespit edilen sonuçların, 3. gün itibariyle bu konsantrasyonun altına inmeye başladığı görülmektedir (Tablo 16).

Bu çalışmada, AM II ile tespit edilen tilosinin 3. gün itibariyle yüksek konsantrasyonlarda olup, hala tespit edilebilir olmasının en önemli nedeni, tilosin uygulamasının 10 mg/kg dozda uygulanmasına rağmen ilaç uygulamasının 5 gün boyunca devam etmiş olmasıdır. Tilosinin serum örneklerinde AM II ile tespit edilen geri kazanım oranı %180'dir (Tablo 7).

Çalışmada, tilosinin serum örneklerinde 1-3 gün arasında AM II yöntemi ile net bir şekilde belirlenebildiği, ancak 15. güne kadar pozitifliğin devam ettiği ve büyük oranda tespit edilebildiği görünmektedir (Tablo 16 ve Şekil 15). Serum örneklerinde tespit edilen yüksek değerler, doku numunelerinde elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, oksitetrasiklinin aksine, bu yüksekliğin kalıntı varlığı açısından bir gösterge olabileceği değerlendirildi (Tablo 17 ve Tablo 18).

Ağız Sıvısı

Tilosinin yüksek lipofilik özellik göstermesi ve düşük iyonizasyon derecesine sahip olması vücut sıvıları ve dokularına yaygın olarak dağılmasını sağlar (Gingerich, Baggot ve Kowalski, 1977; Burrows, 1980). Yapılan farmakokinetik çalışmalarda, kas içi uygulanan tilosinin inek ve buzağılarda yüksek oranda dağılım gösterdiği bildirilmiştir (Ziv ve Sulman 1973; Gingerich ve diğerleri, 1977; Cester,

Ganiereb ve Toutainc, 1993; Burrows, Barto, Martin ve Tripp, 1983; Prats, El Korchi, Francesch, Arboix ve Pere, 2002).

Tilosinin sığır ağız sıvısına geçmesiyle ilgili literatüre rastlanmasa da, AM II ile elde edilen sonuçlara göre, 2 ve 3 numaralı deney hayvanına ait 1. gün örneklerinde yüksek pozitiflik tespit edilmiştir (Tablo 16). Bu değerler, 3. gün itibariyle azalmaya başlamış ve 10. gün itibariyle de 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 16). Çalışmada, tilosinin ağız sıvısında AM II ile tespit edilen geri kazanım oranı %546'dır (Tablo 7). Oruç ve diğerleri (2013), domuz ağız sıvısı örneklerinde biochip array tekniği ile analiz edilen tilosinin recovery oranını %82 olarak belirlemiştir. Farmakokinetik özellikleri ve elde edilen AM II sonuçları dikkate alındığında tilosinin ağız sıvısında tespit edilebileceği ön görülmeyle birlikte, konuyla ilgili detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmada, tilosinin ağız sıvısı örneklerinde son ilaç uygulamasından sonra 1 gün içerisinde AM II yöntemi ile tespit edilebildiği belirlenmiştir (Tablo 16 ve Şekil 16).

Dışkı

Tilosinin temel atılım yolunun dışkı ve süt olduğu bilinmektedir (Botsoglou ve Fletouris, 2000; Avcı ve Elmas, 2014). 17,6 mg/kg dozda, 3 gün boyunca, kas içi yolla uygulanan tilosinin %50'den azı dışkı ve idrarla atılmıştır. Dışkıyla atılan tilosinlerin %29,8'ini tilosin A, %25,2'sini tilosin C, %11,4'ünü tilosin D ve %10,8'ini dimetil-tilosin D oluşturmaktadır (EMEA, 1997a).

AM II ile dışkı örneklerinde tespit edilen tilosin değerleri 1. ve 3. gün maksimum konsantrasyonda seyrettiği görülmektedir (Tablo 16). Sığırlara 7,3 mg/kg dozda tilosinin kas içi yolla, tek doz olarak uygulanmasından 24 saat sonra, safrada tespit edilen tilosin konsantrasyonu 35,1 µg/ml iken, 31 saat sonra bu değer 12,1 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Nouws and Ziv, 1979). AM II sonuçlarına göre ise, son ilaç uygulamasından 72 saat sonra dışkı örneklerinde yüksek pozitifliğin (>43,50 µg/l) devam ettiği görülmektedir (Tablo 16). 21. günün sonunda değerlerin 0. gün ve kontrol değerlerine yakın olmakla birlikte, genellikle üzerinde seyrettiği belirlenmiştir (Tablo 16). Tilosinin dışkıda AM II ile tespit edilen geri kazanım oranı %115'tir (Tablo 7).

Dışkı örneklerinde, kontrol hayvanına ait 15. gün sonucu yüksek pozitiflik (>87,00 µg/kg) göstermiştir (Tablo 16). Kontrol hayvanına ait böbrek numunesinin de aynı şekilde yüksek pozitiflik gösterdiği, ancak yapılan LC-MS/MS doğrulaması ile sonucun hatalı pozitiflik verdiği tespit edilmiştir. Bu durum, tilosinin dışkı örneklerindeki analizinde göz önünde bulundurulmalı ve şüpheli sonuçlar için doğrulama testleri yapılmalıdır.

Çalışmada, tilosinin dışkı örneklerinde 1-3 gün arasında AM II yöntemi ile tespit edilebildiği belirlenmiştir (Tablo 16 ve Şekil 17).

Dokular

Karaciğerde bulunan tilosinin ana bileşeni tilosin A'dır. Karaciğer ve böbrekte bulunan diğer ana metabolitler tilosin D, tilosin C ve cysteinyl-tilosin A'dır. Kasta ise yalnızca tilosin A bileşeni bulunur. Domuz ve sığırlarda yürütülen tilosin analizlerinde hedef organın böbrek olduğunu bildirmektedir (EMA, 1997a).

Çalışmada, yasal arınma süresi sonunda kesime gönderilen hayvanların dokularında tilosinin tespit edilebildiği görülmüştür. AM II sonuçlarına göre, karaciğer örneklerinde 3 deney hayvanına ait değerlerin (>87.00 µg/kg) maksimum kalıntı limitini (100 µg/kg) aşabileceği belirlendi (Tablo 17) ve LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı. LC-MS/MS sonuçlarına göre karaciğer örneklerinde 1 ve 2 numaralı deney hayvanına ait değerler sırasıyla 366,79 µg/kg, 474,60 µg/kg olarak tespit edildi (Tablo 18). Bu değerlerin maksimum kalıntı limitini aştığı görüldü. 3 numaralı deney hayvanına ait LC-MS/MS sonucu ise 84,53 µg/kg olarak tespit edildi ve maksimum kalıntı limitini aşmadığı belirlendi (Tablo 18).

Böbrek örneklerinde ise, 2 deney ve 1 kontrol hayvanına ait değerlerin (>87.00 µg/kg) maksimum kalıntı limitini (100 µg/kg) aşabileceği görüldü ve LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı. LC-MS/MS sonuçlarına göre böbrek örneklerinde 1 numaralı deney hayvanına ait değerlerin (194,35 µg/kg) maksimum kalıntı limitini aştığı tespit edildi (Tablo 18). 2 numaralı deney hayvanına ait LC-MS/MS sonucu 41,09 µg/kg, kontrol hayvanına ait sonuç ise 6,02 µg/kg olarak tespit edildi (Tablo 18). Bu değerlerin maksimum kalıntı limitini aşmadığı görüldü.

Kas örneklerinde ise AM II ile belirlenmiş deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin maksimum kalıntı limitini (100 µg/kg) aşmadığı tespit edildi (Tablo 17).

AM II sonuçlarına göre, yüksek pozitiflik tespit edilen (>87.00 µg/kg) toplam 6 adet karaciğer ve böbrek numunesinden 3'ü kalıntı limitini aşarken, 3 numunenin limitin altında sonuç vermesi bir tarama metodu olan biochip array yöntemi ile elde edilen yüksek pozitifliklerin kromatografik yöntemlerle doğrulanması gerektiğinin önemini ortaya koymaktadır.

2 sığıra 17,6 mg/kg dozda, 3 gün boyunca, kas içi yolla tilosin uygulamasından 4 saat sonra HPLC ile (rutin analitik metot) dokularda tespit edilen tilosin A'nın, toplam tilosine (equivalents) oranı karaciğerde %11, böbrekte %14, kasta ise %25 olduğu bildirilmiştir (EMEA, 1997a). Aynı örnekler mikrobiyal assay ile çalışıldığında bu oranlar (mikrobiyal etkinliğe sahip tilosin A yüzdesi) yaklaşık 3 kat fazla (karaciğerde %31, böbrekte %37 ve kasta %70) bulunmuştur. Bu sonuçlar, kalıntı analizinde kullanılan analiz metodunun ve doğrulama testlerinin önemini göstermektedir.

Çalışmada sağlıklı hayvanların doku örneklerinde maksimum kalıntı limitini aşan sonuçların tespit edilmesi, ilaç metabolizasyonunu ve atılımını etkileyen faktörlerin de devreye girmesi durumunda prospektüste belirtilen yasal arınma süresinin yetersiz kalabileceğini göstermiştir. Tilosine ait yasal arınma süresinin daha kapsamlı çalışmalarla tekrar değerlendirilmesi uygun olacaktır.

5.5. Tilmikosin

Tilmikosin, yağda yüksek oranda çözünür, proteinlere kısmi oranda bağlanır ve zayıf organik bir bazdır (Ziv, Shem-Tov, Glickman, Winkler ve Saran, 1995). Bu özellikleri, tilmikosinin hücre zarlarından kolaylıkla geçmesine ve vücutta hızlı bir şekilde dağılmasına izin verir. Vücutta iyi dağılması nedeniyle özellikle akciğer, karaciğer ve böbrekte yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Giera, Herberg, Klink ve Thomson, 1986; Giera and Peloso, 1988; Brown, Deleeuw, Stahl ve Roof, 1995; Ziv ve diğerleri, 1995). Tilmikosinin karakterize edilmiş tek ana metaboliti T-1

(N-desmetil tilmikosin)'dir. Vücuttan büyük bir kısmı değişmeden atılır (Donoho, 1988). Toplam atılımın yaklaşık dörtte üçü ana bileşikten (tilmikosin), diğer kısımları ise minör metabolitler veya ekstrakte edilemeyen kalıntıdan oluşur (Donoho, Peloso ve Thomson, 1988; Giera and Peloso, 1988). Temel atılım yolu dışkı ve idrardır (EMEA, 1997b).

Türk Gıda Kodeksi (2017), "Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği"nde, tilmikosin için belirleyici kalıntı türü "tilmikosin" olarak tanımlanmıştır (Tablo 8). Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmada AM II ile elde edilen sonuçlar tilmikosin üzerinden değerlendirilmiştir.

Çalışmada tilmikosin, 10 mg/kg dozda, deri altı yolla, tek doz olarak uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, tilmikosinin sığırların kesim öncesi serum, ağız sıvısı; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde, AM II tekniği ile tespit edilebildiği, dışkı örneklerinde ise sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği belirlenmiştir (Tablo 19).

Serum

Serum örneklerinde AM II ile tespit edilen tilmikosin değerlerinin 1. ve 10. günler arasında yüksek seyrettiği, 30. gün itibariyle belirgin olarak azaldığı ve 60. günün sonunda 0. gün ve kontrol değerlerine yaklaştığı görülmektedir (Tablo 19).

Sığırlara 10 mg/kg dozda, deri altı yolla uygulanan tilmikosinin, 1 saat içinde maksimum konsantrasyona ulaştığı (Thomson, 1989), 8 saat sonra ise, serumda 0,35 µg/ml konsantrasyonda tespit edildiği bildirilmiştir (Thomson ve Peloso, 1989). Aynı doz tilmikosin uygulaması sonrası, 1. gün serum örneklerinde AM II ile tespit edilen tilmikosin konsantrasyonları 0,35-0,40 µg/ml arasındadır.

Tilmikosinin serumdaki minimum etkin konsantrasyonu (MEK), 0.1 µg/mL veya üzeri olarak kabul edilmiştir (Ramadan, 1997; Gutiérrez, Soriano, Martínez-Cortes, Miranda-Calderon ve Sumano, 2016). Lombardi, Portillo, Hassfurth ve Hunter (2011), standart bir tilmikosin preparatının 10 mg/kg dozda, deri altı yolla, tek doz olarak uygulanması sonrası serumda tespit edilen konsantrasyonun ancak 72

saat boyunca MEK değerinin (0,1 µg/mL) üzerinde seyrettiğini belirtmiştir. Aynı dozda tilmikosin uygulamasını içeren bir başka çalışmada ise, bu konsantrasyonunun, 96 saat boyunca MEK'in (0,1 µg/ml) üzerinde olduğu ve 120. saat itibariyle bu değerin altına indiği tespit edilmiştir (Gutierrez ve diğerleri, 2016). Avcı ve Elmas (2014), serumdaki tilmikosin konsantrasyonunun, 120. saatin sonunda dahi MEK'in (0,1 µg/ml) üzerinde olduğunu bildirmiştir. AM II ile elde edilen sonuçlarda ise, serumda tespit edilen tilmikosin konsantrasyonunun 10. gün sonunda dahi 0,14 ile 0,23 µg/mL arasında olduğu ve MEK'in (0,1 µg/mL) üzerinde seyrettiği görülmektedir (Tablo 19). Tilmikosinin serum örneklerinde AM II ile tespit edilen geri kazanım oranı %33'tür (Tablo 7).

Çalışmada, tilmikosinin serum örneklerinde 1-10 gün arasında AM II yöntemi ile tespit edilebildiği görünmektedir (Tablo 19 ve Şekil 15).

Ağız Sıvısı

Tilmikosinin, ağız sıvısına geçmesiyle ilgili literatüre rastlanmasa da, sahip olduğu farmakokinetik özellikler (yağda yüksek oranda çözünmesi, proteinlere kısmi oranda bağlanması, zayıf organik baz olması), tilmikosinin ağız sıvısına geçebileceğini düşündürmektedir.

AM II ile elde edilen sonuçlara göre, ağız sıvısı örneklerinde tespit edilen tilmikosin değerleri, 1. gün kısmi bir yükseliş göstermiş, 3. gün itibariyle azalmaya başlamış ve 30. günün sonunda kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 19). Buna rağmen 3. gün kontrol değerinin (100,38 µg/kg) deney gruplarından bile yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 19). Bu durum, ağız sıvısında pozitifliği artıran başka maddelerin de olabileceğini göstermektedir. Tilmikosinin ağız sıvısı örneklerinde AM II ile tespit edilen geri kazanım oranı %136'dır (Tablo 7).

AM II ile elde edilen sonuçlara göre, tilmikosinin ağız sıvısına eser miktarda da olsa geçebildiği, ancak sonuçların kalıntı varlığını sağlıklı bir Şekilde değerlendirecek yeterlilikte olmadığı, benzer bir çalışmanın kromatografik yöntemlerle tekrarlanmasının uygun olacağı grlmştir.

Çalışmada, tilmikosinin ağız sıvısı örneklerinde son ilaç uygulamasından sonra 1 gün içerisinde çok düşük miktarlarda da olsa AM II yöntemi ile tespit edilebildiği belirlenmiştir (Tablo 19 ve Şekil 16).

Dışkı

Deri altı yolla, 30 mg/kg dozda tilmikosin uygulaması sonrası 15 gün boyunca toplanan dışkı ve idrar örneklerinde, toplam dozun yaklaşık %72'sinin dışkıyla, %19'unun da idrarla atıldığı tespit edilmiştir (Giera, Herberg ve Thomson, 1987; EMEA, 1997b).

Dışkı örneklerinde tespit edilen tilmikosin değerleri 1. gün maksimum konsantrasyona ulaşmış ve 3. gün itibariyle azalmaya başlamıştır. Ancak 60. günün sonunda bile 1 ve 3 numaralı deney hayvanlarına ait değerlerin (1140,54 µg/kg; 955,84 µg/kg) 0. gün ve kontrol değerlerinin üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 19). Dışkı örneklerinde kontrol değerlerinin genel olarak 0. gün düşük, diğer günler yüksek seyrettiği görülmektedir (Tablo 19).

Kontrol hayvanlarında yüksek pozitifliklerin bulunması ve tespit edilen düşük geri kazanım oranı (%15), dışkı örneklerinde tilmikosinin AM II ile analizinin sağlıklı olmadığını göstermiştir (Tablo 7).

Dokular

Tilmikosinin, vücutta iyi dağılım gösterdiği ve özellikle akciğer, karaciğer ve böbrekte yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu bilinmektedir (Giera ve diğerleri, 1986; Giera ve Peloso, 1988; Brown ve diğerleri, 1995; Ziv ve diğerleri, 1995).

Yasal arınma süresi sonunda kesime gönderilen hayvanların dokularında tilmikosinin tespit edilebildiği görüldü. AM II sonuçlarına göre, karaciğer örneklerinde 1 ve 3 numaralı deney hayvanına ait değerlerin (>235,14 µg/kg), maksimum kalıntı limitini (1000 µg/kg) aşabileceği görüldü (Tablo 20). Buna göre, yüksek pozitiflik gösteren 3 numaralı deney hayvanına ait karaciğer örneğinin LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı. LC-MS/MS sonucuna göre karaciğerdeki tilmikosin konsantrasyonu 542,31 µg/kg olarak tespit edildi ve maksimum kalıntı limitini

aşmadığı görüldü (Tablo 21). Böbrek ve kas örneklerinde ise, deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin, maksimum kalıntı limitinin (sırasıyla 1000 µg/kg ve 50 µg/kg) altında olduğu belirlendi (Tablo 20).

Sığırlara 20 mg/kg dozda, deri altı yolla, tilmikosin uygulamasından 3 gün sonra karaciğerde 36.0 µg/g, böbrekte 39.2 µg/g ve kasta 1.96 µg/g konsantrasyonda tilmikosin tespit edilmiştir (Modric, 1997). 14 günlük yasal arınma süresi sonunda ise karaciğer ve böbrekte tespit edilen tilmikosinin, kastaki konsantrasyonlarına oranla 20 kat fazla olduğu bildirilmektedir (EMEA, 1997b). AM II ile elde edilen sonuçlarda ise, bu oranın yaklaşık olarak 9 ile 14 kat arasında değiştiği görülmektedir (Tablo 20).

Çalışmada elde edilen AM II sonuçları ile prospektüste belirtilen 60 günlük yasal arınma süresinin uyumlu ve yeterli olduğu tespit edildi.

5.6. Florfenikol

Florfenikolün proteinlere bağlanma oranı (%12,7-18,6) düşüktür (Lobell ve diğerleri, 1994, Afifi ve El-Sooud, 1997; Birdane ve diğerleri, 2015). Karaciğer, böbrek, kas ve akciğerler başta olmak üzere pek çok dokuya iyi dağılım gösterir (Afifi ve El-Sooud, 1997; Lohani, Ahmad, Singh ve Verma, 2010). Uygulanan florfenikolün bir kısmı metabolize olur. Florfenikolün hidrolizasyonu sonucu oluşan tüm metabolitler (florfenikol alkol, florfenikol oksamik asit, monokloro-florfenikol ve florfenikol amin), büyük oranda ana metabolit olan florfenikol amine dönüşür (EMEA, 1996). Yaklaşık %63-71'i idrar (EMEA, 1996), bir kısmı da dışkı ile atılır (Varma, Adams, Powers, Powers ve Lamendola, 1986; Sams, 1994).

Florfenikolün kalıntı belirteci, otoriteler tarafından farklı şekilde tanımlanmıştır. ABD (FAO/WHO, 2018) tarafından belirleyici kalıntı türü "florfenikol amin" olarak belirlenirken, Türk Gıda Kodeksi (2017), "Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği"nde, Avrupa Birliği ile uyumlu olarak "florfenikol ve florfenikol amin toplamı" olarak tanımlanmıştır (Tablo 8). Bu nedenle çalışmada elde edilen sonuçların bu açıdan değerlendirilmesi sağlıklı olacaktır.

Ancak biochip array yönteminin florfenikol için belirlediği cross-reaktivite değeri %100 iken, florfenikol amin için bu değer <1 olarak belirlenmiştir (Tablo 8). Bu nedenle, kesim sonrası AM II sonuçları florfenikol ana molekülü üzerinden hesaplanmıştır. Kesim öncesi alınan serum, ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde ise kit yetersizliği nedeniyle geri kazanım değeri belirlenemediğinden, elde edilen sonuçlar nitel olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, florfenikol 20 mg/kg dozda, 48 saat arayla, günde 1 defa, kas içi yolla, 2 doz olarak uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, florfenikolün sığırların kesim öncesi serum ve dışkıda; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde AM II tekniği ile tespit edilebildiği, ağız sıvısı örneklerinde ise sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği belirlenmiştir (Tablo 22).

Serum

Florfenikol 20 mg/kg tek dozda, kas içi uygulandıktan 3 saat sonra serumda maksimum konsantrasyona (3,0 µg/ml) ulaşmaktadır (Soback, Paape, Filep ve Varma, 1995; Lobell ve diğerleri, 1994). Sidhu ve diğerleri (2009) tarafından yürütülen çalışmada, sığırlara 40 mg/kg dozda, deri altı yolla, tek doz olarak uygulanan florfenikolün, serumda 15 dakika ile 80 saat arasında tespit edilebilir olduğu belirlenmiştir. AM II sonuçlarına göre, serum örneklerindeki 1. ve 10. günler arasında yüksek pozitiflik tespit edildiği, bu yüksekliğin 20. güne kadar devam ettiği görülmektedir (Tablo 22). Serum örneklerinde uzun süreli (1-20 gün) pozitiflik görülmesinin en önemli nedeni, florfenikolün 20 mg/kg dozda uygulanmasına rağmen ilaç uygulamasının 48 saat sonra 2. doz olarak tekrarlanmasıdır.

Çalışmada, florfenikolün, serum örneklerinde 1-10 gün arasında AM II yöntemi ile net bir şekilde belirlenebildiği, 20. güne kadar pozitifliğin devam ettiği ve büyük oranda tespit edilebildiği görüldü (Tablo 22 ve Şekil 15). Ancak metotla ilgili geri kazanım çalışmalarının yapılması ve sonuçların kromatografik sistemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Ağız Sıvısı

Florfenikol, pek çok dokunun yanı sıra, süt (Soback ve diğerleri, 1995), eklem sıvısı (Gilliam, Streeter, Papich, Washbur ve Payton, 2008), omurilik sıvısı (Adams, Varma, Powers ve Lamendola, 1987; De Craene ve diğerleri, 1997) gibi vücut sıvılarına da nüfuz eder. Florfenikolün ağız sıvısına geçişiyle ilgili literatüre ratlanmasa da, vücut sıvılarına yaygın olarak dağılım göstermesi, ağız sıvısına da geçebileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre deney ve kontrol grubu tüm hayvanların, ilaç uygulamadan önceki ve sonraki tüm sonuçlarında yüksek pozitiflik (>46,00 µg/kg) tespit edilmiştir (Tablo 22). İlaç uygulamasından bağımsız bir şekilde elde edilen bu sonuçlar, ağız sıvısında yüksek pozitifliğe neden olan maddelerin bulunabileceğini, matriksin ya da uygulanan ekstraksiyon metodunun bu yöntem için uygun olmadığını göstermiştir.

Dışkı

Florfenikol, yüksek oranda idrarla, düşük oranda dışkı ile atılım gösterir (Varma ve diğerleri, 1986; Sams, 1994). Varma ve diğerleri (1986), sığırlara uygulanan florfenikolün %65'inin idrarla, geri kalan miktarın da bir bölümünün dışkı ile atıldığını tespit etmiştir. Domuzlarda yapılan bir çalışmada ise, 20 mg/kg dozda, 48 saat arayla 2 doz olarak, kas içi yolla uygulanan florfenikolün %67,81'inin vücuttan atıldığı, bunun da %81'inin idrar, %19'unun dışkı yolu ile olduğu bildirilmiştir (EMEA, 1999b). Atılım yüzdeleri dolayısıyla tercih edilen biyolojik örnek genellikle idrar olduğundan, florfenikolün dışkı örneklerindeki analizine dair çalışmaya rastlanmamıştır.

AM II ile, dışkı örneklerinde tespit edilen florfenikol değerlerinin, 1. gün maksimum konsantrasyona ulaştığı, 3. gün kısmi olarak azalmaya başladığı ve 20. günde yapılan analizlerde 0. gün ve kontrol değerlerine indiği görülmüştür (Tablo 22).

Çalışmada, florfenikolün dışkı örneklerinde 1-3 gün arasında AM II yöntemi ile tespit edilebildiği görünmektedir (Tablo 22 ve Şekil 17).

Dokular

Florfenikol analizlerinde hedef organların karaciğer, böbrek ve kas olduğunu bildirilmekte ve maksimum kalıntı limitleri, florfenikol ve florfenikol amin toplamı üzerinden tanımlanmaktadır (TGK, 2017). Ancak bu çalışmada kullanılan AM II yöntemi florfenikole duyarlıdır (Tablo 8). Bu nedenle elde edilen analiz sonuçları "florfenikol" üzerinden hesaplanmıştır. Sonuçlar yorumlanırken bu durumun göz önünde bulundurulması gerekir.

Yasal arınma süresi sonunda kesime gönderilen hayvanların dokularında florfenikolün AM II ile tespit edilebildiği belirlendi. Bu sonuçlara göre, karaciğer örneklerinde 3 numaralı deney hayvanına ait değer ($>92.00 \mu\text{g/kg}$) maksimum kalıntı limitini ($3000 \mu\text{g/kg}$) aşabileceği görüldü (Tablo 23) ve LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı. LC-MS/MS sonuçlarına göre, bu değer $0,2 \mu\text{g/kg}$ olarak tespit edildi ve maksimum kalıntı limitini aşmadığı ortaya kondu (Tablo 24). Diğer karaciğer, böbrek ve kas örneklerine ait tüm değerlerin maksimum kalıntı limitini aşmadığı tespit edildi (Tablo 23).

Domuzlarda yürütülen bir çalışmada 20 mg/kg dozda, 48 saat arayla 2 doz olarak, kas içi yolla florfenikol uygulanmasından 3 gün sonra karaciğerde $9612 \mu\text{g/kg}$, böbrekte $3788 \mu\text{g/kg}$ ve kasta $366 \mu\text{g/kg}$ konsantrasyonda florfenikol amin tespit edilmiştir (EMEA, 1999b). Bu değerler 12. gün sonunda, karaciğerde $2222 \mu\text{g/kg}$, böbrekte $738 \mu\text{g/kg}$ ve kasta $97 \mu\text{g/kg}$ konsantrasyona düşmüştür. Florfenikol amin konsantrasyonunun toplam kalıntıya oranı 3. gün sonunda karaciğer için %94, böbrek için %68 ve kas için %100 olarak tespit edilmiştir. Bu oranlar, 12. gün sonunda karaciğer için %75, böbrek için %55, kas için ise hesaplanamayacak düşüklükte belirlenmiştir (EMEA, 1999b). Bu değerlere bakıldığında, son ilaç uygulamasından sonraki günlerde, florfenikol aminin toplam kalıntıya oranında düşüş görülmüştür. Bu çalışmada domuzların karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilen florfenikol konsantrasyonları arasında belirgin bir fark varken, AM II ile elde edilen sonuçlarda dokular arasında ciddi bir farka rastlanmamıştır (Tablo 23).

Çalışmada elde edilen AM II sonuçları ile prospektüste belirtilen 30 günlük yasal arınma süresinin uyumlu ve yeterli olduğu görülmüştür.

5.7. Penisilin G

Penisilin G'nin farklı formları (sodyum ve potasyum tuzları, kristalize, prokain ve benzatin), ilacın çözünürlüğünü, emilimini ve vücutta kalış süresini doğrudan etkilemektedir. Uygulanan preparatın içeriğini bilmek, bu parametrelerin değerlendirilmesi için önem taşır. Çalışmada kullanılan Penoksal LA, prokain penisilin G, benzatin penisilin G ve streptomisin kombinasyonundan oluşmaktadır. Prokain penisilin G'nin çözünürlüğü düşüktür, yavaş emilir ve uygulandıktan sonra yaklaşık 12-24 saate kadar etkin konsantrasyonda kalır (Papich, 2016; Botsoglou ve Fletouris, 2001). Benzatin penisilin G'nin de yine yavaş emilim gösterdiği ve ilacın etki süresini uzattığı bilinmektedir. Tüm bu özellikler, uygulanan preparatın uzun etkili olmasını sağlamaktadır (Papich, 2016). Penisilin G'nin proteinlere bağlanma oranı %50-60'tır. Vücutta büyük oranda değişime uğramadan, neredeyse tamamına yakını böbrekler aracılığıyla idrarla (%85-95), çok düşük miktarlarda da (%5) dışkı ile atılır (JECFA,1990; EMEA, 2008).

Türk Gıda Kodeksi (2017), "Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği"nde, penisilin G için belirleyici kalıntı türü "benzilpenisilin (penisilin G)" olarak tanımlanmıştır (Tablo 8). Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmada BLACT ile elde edilen sonuçlar penisilin G üzerinden hesaplanmıştır. Penisilin G'nin, kesim öncesi alınan serum, ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde kit yetersizliği nedeniyle geri kazanım değeri belirlenemediğinden, elde edilen sonuçlar nitel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada penisilin G (10.000 IU/ml prokain penisilin G+10.000 IU/ml benzatin pensilin G), 1ml/20 kg dozda, günde 1 defa, 4 gün boyunca, kas içi yolla, uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, penisilin G'nin sığırların kesim öncesi serum; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde BLACT ile tespit edilebildiği; ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde ise sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği belirlenmiştir (Tablo 25).

Serum

Prokain penisilin G'nin parental olarak enjekte edildiğinde, kandaki doruk konsantrasyona 5 saat içinde ulaştığı ve uygulamadan yaklaşık 24 saat sonra plazmayı terk ettiği bildirilmektedir (JECFA, 1990). Djebala ve diğerleri (2021), 12 adet yetişkin sığır üzerinde yaptıkları çalışmada, 21,000 IU/kg dozda, kas içi yolla uygulanan prokain penisilin G'nin 1 ile 8 saat içerisinde plazmada maksimum konsantrasyona ulaştığını tespit etmiştir. BLACT II ile elde edilen sonuçlarda da, serum örneklerinde tespit edilen penisilin G değerinin 1. gün maksimum konsantrasyona ulaştığı, 3. günün sonunda ciddi oranda azalarak 0. gün ve kontrol değerlerine indiği belirlenmiştir (Tablo 25).

Çalışmada, penisilin G'nin serum örneklerinde son ilaç uygulamasından sonra 1 gün içerisinde BLACT yöntemi ile tespit edilebildiği belirlenmiştir (Tablo 25 ve Şekil 15). Ancak metotla ilgili geri kazanım çalışmalarının yapılması ve sonuçların kromatografik sistemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Ağız Sıvısı

Penisilinlerin hücre dışı sıvıya geçişi oldukça düşüktür (Botsoglou ve Fletouris, 2001). Çalışmada, deney ve kontrol grubuna ait ağız sıvısı örneklerinde tespit edilen tüm değerlerin benzer olduğu belirlenmiştir (Tablo 25). Buna göre, penisilin G'nin, ağız sıvısı örneklerinde BLACT yöntemi ile tespiti mümkün görünmemektedir.

Dışkı

BLACT sonuçlarına göre, dışkı örneklerinde ilaç uygulamasından önceki ve sonraki günlerde deney grubuna ait değerlerin kontrol değerleriyle benzer seyrettiği görülmektedir. Elde edilen analiz sonuçları (Tablo 25) ve penisilinlerin tamamına yakınının idrar ile atılıyor olması (JECFA, 1990; EMEA, 2008), penisilin G'nin, BLACT yöntemi ile dışkı örneklerinde tespit edilemeyeceğini ortaya koymaktadır.

Dokular

BLACT yönteminde firma tarafından penisilin G'nin doku örneklerine ait cross-reaktivite değeri belirlenmemiştir. Kit yetersizliği nedeniyle de geri kazanım çalışması yapılamamıştır. Cross-reaktivite/ geri kazanım değerleri olmadan doku örneklerinde tespit edilen konsantrasyonların kalıntı varlığı açısından değerlendirilmesi sağlıklı olmayacaktır. Bu nedenle, elde edilen sonuçların genel değerlendirilmesi yapılmış olup, aşağıda belirtilmiştir.

Belirlenen yasal arınma süresi prokain penisilin G için 10 gün, benzatin penisilin G için 30 gün, streptomisin için 60 gündür. Çalışmada kullanılan preparat penisilinlere ek olarak streptomisin de içerdiğinden dolayı bu süre 60 gün olarak tanımlanmıştır.

Yasal arınma süresi sonunda alınan karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde penisilin G'nin BLACT ile tespit edilebildiği belirlendi. Deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin 50 µg/kg olan maksimum kalıntı limitini aşmadığı görüldü (Tablo 26).

Korsrud ve diğerleri (1993), sığırlara günde 1 defa, 5 gün boyunca, kas içi yolla 2 farklı dozda prokain penisilin G uygulamış ve ilaç uygulanan hayvanlardan farklı günlerde karaciğer, böbrek ve kas örnekleri toplamıştır. Buna göre, prokain penisilin G konsantrasyonu, 24.000 IU/kg dozda ilaç uygulandığında 8. günde; 66.000 IU/kg dozda uygulandığında ise 12. günde tespit edilebilir limitin altına (<5 µg/kg) indiği görülmüştür. 8 ve 12 gün gibi kısa bir sürede dokulardaki kalıntının ortadan kalkması kullanılan ilacın sadece prokain penisilin G içermesinden kaynaklanmaktadır.

Benzatin ve prokain penisilin G kombinasyonu sığırlara, 8.800 IU/kg dozda, deri altı yolla uygulanmış ve 30 günlük yasal arınma süresi sonunda dokularda kalıntı varlığı incelenmiştir (Korsrud ve diğerleri, 1994). Analiz sonuçlarına göre, karaciğer, böbrek ve kasta tespit edilen konsantrasyonlar maksimum kalıntı limitini aşmazken, enjeksiyon bölgesindeki seviyeler maksimum kalıntı limitinin yaklaşık 30-60 katı üzerinde tespit edilmiştir. Yasal arınma süresi sonunda dahi, enjeksiyon

bölgelerinde tespit edilen yüksek konsantrasyonlar kalıntı varlığı açısından ciddi risk oluşturmaktadır.

Çalışmada kullanılan ticari ürün streptomisin içerdiğinden dolayı elde edilen sonuçlar, prospektüste bildirilen 60 günlük yasal arınma süresine göre değerlendirilmiştir. Buna göre, yasal arınma süresinin karaciğer, böbrek ve enjeksiyon bölgesi haricindeki kas dokusu için uyumlu ve yeterli olduğu görülmüştür.

5.8. Amoksisilin

Kullanılan preperatın yapısında bulunan amoksisilin formu (amoksisilin trihidrat, amoksisilin sodyum) ilacın çözünürlüğünü, emilim hızını ve etki süresini belirlemektedir. Çalışmada kullanılan preperat, amoksisilin trihidrat ve klavulanik asit kombinasyonundan oluşmaktadır. Amoksisilin trihidrat, sodyum tuzuna göre suda daha az çözünür, dokulardan daha geç emilir (Fernandez, M*odamio, Mestorino, Errecalde ve Mariño, 2007; Park, Awji, Suh ve Park., 2016). Bu özellikleri sayesinde vücutta daha uzun süreli etkinlik sağlar. Amoksisilin, plazma proteinlerine zayıf oranda bağlanır, vücut dokularına yaygın olarak dağılır ve enterohepatik dolaşıma da girer (Bogan, Lees ve Yoxall, 1983; Boffa, De Preneuf, Bouadma, Daudon ve Pallot, 2000; Yasmeen ve Rabbani, 2017; Özdemir, Traş, Üney, Faki ve Beşoluk, 2019). Yapısında bulunan beta-laktam halkasının parçalanması ile amoksisilik asite, onun da yıkılmanmasıyla diketopiperazine-2',5'-dione dönüşür (Nägele ve Moritz, 2005; Reyns, De Boever, De Baere, De Backer ve Croubels, 2008). Bu dönüşüm oldukça sınırlıdır ve çoğunlukla değişmemiş formda vücuttan atılır (Özdemir ve diğerleri, 2019). Amoksisilin atılımı büyük oranda böbrekler aracılığıyla olur. Kas içi yolla uygulanan amoksisilin %50-60'ının, 24 saat içinde idrar ile atıldığını bildirilmiştir (JECFA, 2011). Bu nedenle uygulandıktan kısa süre sonra hem böbrek dokusunda hem de idrarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Botsoglou ve Fletouris, 2001).

Türk Gıda Kodeksi (2017), "Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği"nde, amoksisilin için belirleyici kalıntı türü "amoksisilin" olarak

tanımlanmıştır (Tablo 8). Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmada BLACT ile elde edilen sonuçlar amoksisilin üzerinden hesaplanmıştır. Kesim öncesi alınan serum, ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde, kit yetersizliği nedeniyle geri kazanım değeri belirlenemediğinden, elde edilen sonuçlar nitel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada amoksisilin, 1ml/20kg (7 mg/kg amoksisilin trihidrat+1,75 mg/kg klavulanik asit) dozda, günde 1 defa, 5 gün boyunca, kas içi yolla, uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, amoksisilin sığırların kesim öncesi serum; kesim sonrası ise karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde BLACT ile tespit edilebildiği; ağız sıvısı ve dışkı örneklerinde ise sağlıklı bir şekilde tespit edilemediği belirlenmiştir (Tablo 27).

Serum

Amoksisilin trihidratın, ineklere, 10 mg/kg dozda, tek doz olarak, kas içi yolla uygulanmasının ardından 1,32 ile 2,6 saat içinde maksimum konsantrasyona ulaştığı, yarılanma süresinin de yaklaşık 9 saat olduğu belirtilmiştir (Nouws ve Ziv, 1978b; Nouws, Guelen, Mevius ve Driessens, 1986). Özdemir ve diğerleri (2019) yaptıkları çalışmada, ineklere 14 mg/kg dozda, kas içi yolla, tek doz olarak amoksisilin trihidrat uygulamıştır. Uygulama sonrası, amoksisilin serumda 1,50 saat için de maksimum konsantrasyona ulaştığı, plazma yarı ömrünün 6,05 saat olduğu ve serumda tespit edilen amoksisilin konsantrasyonun, >12 saat süreyle minimum inhibitör konsantrasyonun (0,25 µg/ml) üzerinde seyrettiği tespit edilmiştir. Koyunlara, 10 mg/kg dozda amoksisilin trihidratın, kas içi yolla, tek doz olarak uygulandığı bir çalışmada, serumda tespit edilen konsantrasyonlar, 12. saatte $0,57 \pm 0,28$ µg/ml iken, 24. saatte $0,098 \pm 0,07$ µg/ml olarak belirlenmiş ve 24 saat sonundaki değerin minimum inhibitör konsantrasyonun (0,25 µg/ml) altında tespit edilmiştir (Fernandez ve diğerleri, 2007).

BLACT ile elde edilen sonuçlarda, serum örneklerindeki amoksisilin konsantrasyonu, 1. ve 3. gün maksimum konsantrasyonda seyrederken, 10. günde 0. gün ve kontrol değerlerine inmiştir (Tablo 27). Amoksisilin konsantrasyonu, son ilaç uygulamasından sonra 3 gün boyunca serumda maksimum konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Bu sürenin, diğer çalışmalarda belirtilen sürelerden uzun olmasının en

önemli nedeni, ilacın tek doz olarak değil, muhtemelen 5 gün boyunca tekrarlı olarak uygulanmış olmasıdır.

Amoksisilinin, serum örneklerinde 1-3 gün arasında BLACT yöntemi ile tespit edilebildiği görünmektedir (Tablo 27 ve Şekil 15). Ancak metotla ilgili geri kazanım çalışmalarının yapılması ve sonuçların kromatografik sistemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Ağız Sıvısı

Çalışmada, deney ve kontrol grubuna ait ağız sıvısı örneklerinde ilaç uygulamasından önce ve sonra tespit edilen tüm değerlerin benzer olduğu görülmüştür (Tablo 27). Buna göre, amoksisilinin ağız sıvısına geçmediği, geçse dahi var olan düşük miktarların çalışmada uygulanan metot ve yöntem ile tespit edilemediği belirlenmiştir.

Dışkı

Deney ve kontrol grubuna ait hayvanların dışkı örneklerinde tespit edilen tüm değerlerin benzer olduğu ve ilaç uygulamasından sonra konsantrasyonlarda bir değişim olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 27). Elde edilen bu sonuçlar, amoksisilinin dışkı örneklerinde BLACT ile tespit edilemediğini göstermektedir. Bu durum, amoksisilinin büyük oranda idrar ile atılıyor olması ile ilişkilendirilmiştir.

Dokular

BLACT yöntemi amoksisilinin süt örneklerindeki analizi için tanımlanmıştır ve doku örneklerine ait cross-reaktivite değeri belirlenmemiştir. Kit yetersizliği nedeniyle de geri kazanım çalışması yapılamamıştır. Cross-reaktivite/ geri kazanım değerleri olmadan doku örneklerinde tespit edilen konsantrasyonların kalıntı varlığı açısından değerlendirilmesi sağlıklı olmayacaktır. Bu nedenle, elde edilen sonuçların genel değerlendirilmesi yapılmış olup, aşağıda belirtilmiştir.

Yasal arınma süresi sonunda kesime gönderilen hayvanların dokularında amoksisilinin BLACT ile tespit edilebildiği belirlendi (Tablo 28).

Buzağılara 17,6 mg/kg dozda, günde bir defa, 7 gün boyunca, kas içi yolla amoksisilin uygulamasından 22 gün sonra, böbrekte 40 µg/kg; kasta 30 µg/kg ve karaciğerde <0,01 µg/kg konsantrasyonda amoksisilin tespit edilmiştir (Smith ve Moore, 1976). Smith ve Moore (1976), dokular arasındaki amoksisilin konsantrasyonunda bir miktar fark tespit etse de, BLACT ile elde edilen sonuçlara göre ise, son ilaç uygulamasından 20 gün sonra alınan doku numuneleri arasında belirgin bir farka rastlanmamıştır (Tablo 28). Sığırlara 7 mg/kg dozda, günde 1 defa, 5 gün boyunca kas içi yolla amoksisilin uygulanan çalışmada, son ilaç uygulamasından 2 gün sonra karaciğer, böbrek ve kasta; 28 gün sonra ise enjeksiyon bölgesinde tespit edilen amoksisilin konsantrasyonlarının 50 µg/kg'ın altına indiği belirlenmiştir (Connolly, Prough and Lesman, 2006).

Çalışmada, karaciğer ve böbrek örneklerinde deney ve kontrol hayvanlarına ait tüm değerlerin maksimum kalıntı limitini (50 µg/kg) aşmadığı tespit edildi (Tablo 28). Kas örneklerinde deney grubuna ait değerlerin maksimum kalıntı limitini aşmadığı görülürken, kontrol hayvanına ait değer (50,48 µg/kg), kas için 50 µg/kg olan maksimum kalıntı limitini aştığı belirlendi (Tablo 28) ve LC-MS/MS ile doğrulaması yapıldı. Buna göre, kas örneğine ait BLACT sonucu 50,48 µg/kg iken, LC-MS/MS ile elde edilen sonuç 0,10 µg/kg olarak tespit edildi ve maksimum kalıntı limitini aşmadığı görüldü (Tablo 29). Çalışmada elde edilen sonuçlar ile prospektüste belirtilen 20 günlük yasal arınma süresinin uyumlu olduğu ön görüldü.

Bir tarama testi olan BLACT ile kalıntı limitini aştığı belirlenen değer, doğrulama testi olan LC-MS/MS ile limitin çokça altında kaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, tarama testleriyle elde edilen pozitifliklerin, kromatografik yöntemlerle doğrulanmadan pozitif kabul edilmesinin, sonucun yanlış değerlendirilmesine neden olabileceğini ve kalıntı analizinde kullanılan metodunun ve doğrulama testlerinin önemini göstermektedir.

Sonuç olarak, biochip array based immunoassay sonuçlarına göre, sığırların kesim öncesi alınan serum örneklerinde oksitetrasiklin, enrofloksasin, tilosin, tilmikosin, florfenikol, penisilin G ve amoksisilin; ağız sıvısında oksitetrasiklin, seftiofur, enrofloksasin, tilosin ve tilmikosinin; dışkı örneklerinde ise tilosin ve florfenikolün tespit edilebildiği belirlenmiştir.

Antimikrobiyallerin tespit edilebilirliği ve numune alım kolaylığı göz önünde bulundurulduğunda, kesim öncesi kalıntı analizinde kullanılabilir en uygun örneğin serum olduğu değerlendirilmiştir.

Kesim sonrası alınan karaciğer, böbrek ve kas örneklerinde tespit edilen antimikrobiyal konsantrasyonlarının, tilosin hariç, maksimum kalıntı limitini aşmadığı ve prospektüste belirtilen yasal arınma süreleriyle uyumlu olduğu görölmüştür. Tilosinin karaciğer ve böbrek örneklerinde biochip array tekniği ve LC-MS/MS ile tespit edilen konsantrasyonlarının maksimum kalıntı limitlerini aştığı tespit edilmiştir. Bu kapsamda, tilosinin prospektüste belirtilen yasal arınma sürelerinin yetersiz kalabileceği değerlendirilmiştir.

Antimikrobiyal ilaç kalıntılarının, sığırların kesim öncesi ve sonrası alınan örneklerde biochip array based immunoassay yöntemi ile hızlı ve pratik bir şekilde belirlenebildiği ortaya konmuştur. Serum, ağız sıvısı ve dışkı gibi biyolojik örneklerden özellikle serumun, kalıntı varlığının belirlenmesinde ön belirteç olarak kullanılabilir görölmüştür. Gıda değeri olan hayvanlara terapötik dozlarda uygulanan antibiyotiklere ait yasal arınma sürelerinin genel olarak yeterli olduğu belirlenmiştir. Buradaki sonuçlar, tarama yöntemi ile elde edildiğinden, bu konuda yapılacak daha kapsamlı ve doğrulama yöntemleriyle senkronize edilmiş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kesim öncesi ve kesim sonrası örnekler üzerinden yürütölen kalıntı kontrol sistemlerinin kurulması, tüketici ve toplum sağlığının korunması yanında ekonomik açıdan da önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abraham, E. P. & Loder, P. B. (1972) Cephalosporin C. Flynn E. H. (Ed.), *Cephalosporins and Penicillins*. Newyork and London: Academic Press.
- Adams, P. E., Varma, K. J., Powers, T. E., & Lamendola, J. F. (1987). Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in male veal calves given repeated doses. *American Journal of Veterinary Research*, 48(12), 1725–32.
- Afifi, N. A., & El-Sooud, K. A. (1997). Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *British Poultry Science*, 38(4), 425-28.
- Alper, N. (2015). Gıda analizlerinin piyasa gözetimi ve denetimi çerçevesinde genel değerlendirmesi. *Türklab/Eurolab İstanbul Konferansı*.
- Altan, F. (2013). *Seftiofurun yeni doğan buzağılardaki dozaj rejimi üzerine deneysel şok ve kombine tedavi uygulamalarının etkilerinin belirlenmesi*. [Yayınlanmış doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü].
- Antunes, P., Machado, J., & Peixe, L. (2006). Illegal use of nitrofurans in food animals: contribution to human salmonellosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(11), 1047-49.
- Ardıç, M., & Durmaz, H. (2006). Peynirde starter kültür gelişimini etkileyen faktörler. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1(3) 69-73.
- Avcı, T., & Elmas, M. (2014). Milk and blood pharmacokinetics of tylosin and tilmicosin following parenteral administrations to cows. *Scientific World Journal*. doi: 10.1155/2014/869096.
- Ayaz, C. (2008). Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. Topçu, A. W., Söyletir, G., & Doğanay, M. (Eds.) *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi sistemlere göre enfeksiyonlar* (3. baskı) (s.266-78). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Aydemir M. (2004). *Antibiyotiklerin etki mekanizmaları*. [Yayınlanmış bitirme ödevi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi].
- Aydemir, M. E., Altun, S. K., & Durmaz, H. (2019). Şanlıurfa ilinde satışa sunulan kıymalarda premi®test ile antibiyotik ilaç kalıntılarının tespiti. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8(2), 128-31.
- Balcı R. S. (2007). *Seyhan baraj gölünün bakteriyolojik kirlilik düzeyinin belirlenmesi ve Enterobacteriaceae üyelerinde antibiyotik dirençliliği*. [Yayınlanmış yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Banting, A., Mignot, A., Lefebvre, M. A., Millerioux, L., Steffan, J., & Gilbertson, T. J. (1989). Plasma profile and pharmacokinetic parameters in calves after single (iv and im) and multiple dose administration (im) of ceftiofur sodium. *The Upjohn Company*: TR 788-9760-88-018.
- Barragry, T. B. (1994). *Veterinary drug therapy*. Philadelphia: *Lea & Febiger*, 224(6), 251-62.
- Barza, M. (2002). Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 123-25.
- Beconi-Barker, M. G., Davison, K. L., Hornish, R. E., Arnold, T. S., Craigmill, A. L., Gilbertson, T. J., ... Gatchell, C., L. (1995). [14C] Ceftiofur sodium absorption, distribution, metabolism, and excretion in sheep following intramuscular injections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(6), 1589–97.
- Bekar, A. (2013). Tüketicilerin gıda güvenliğine yönelik tutumları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(2), 90-101.

- Belda, M. P., Campillo, N., Manzanares, N. A., Córdoba, M. H., & Viñas, P. (2020). Determination of amphenicol antibiotics and their glucuronide metabolites in urine samples using liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1146, 122122.
- Birdane, Y., Birdane, F. M., Özdemir, M., Kabu, M., & Yavuz, H. (2015). Pharmacokinetic of florfenicol after administration in sheep. *Kocatepe Veterinary Journal*, 8(1), 19-24.
- Black, W. D. (1984). The use of antimicrobial drugs in agriculture. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 9(62), 1044.
- Boffa, J. J., De Preneuf, H., Bouadma, L., Daudon, M., & Pallot, J. L. (2000). Acute renal failure after amoxicillin crystallization. *Presse Médicale*, 29(13), 699-701.
- Bogan, J. A., Lees, P., & Yoxall, A. T. (1983). *Pharmacological basis of large animal medicine* (1st edition). Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Boothe, S. A. (1994). Enrofloxacin revisited. *Veterinary Medicine Journal*, 89, 744-53.
- Botsoglou, N. A., & Fletouris, D. J. (2001). *Drug residues in foods: Pharmacology, food safety and analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Brambilla, N. L., Cenci, T., Franconi, F., Galarini, R., Macri, A., & Rondoni, F. (2000). Clinical ve pharmacological profile in a chemical growth regulatory in animal production. *proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 18, 26-28.
- Brande, G. C., & Pugh, D. M. (1977). *Veterinary applied pharmacology and therapeutics* (3rd edition). London: Bailliere Tindal.
- Bregante, M. A., Saez, P., Aramayona, J. J., Fraile, L., Garcia, M. A., & Solans, C., (1999). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in mice, rats, rabbits, sheep, and cows. *American Journal of Veterinary Research*, 60, 1111-16.
- Brown, S. A. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19, 1-14.
- Brown, S. A., Deleeuw, N. R., Stahl, G. L., & Roof, R. D. (1995). Characterization of plasma and lung concentrations after ceftiofur sodium and tilmicosin phosphate administered subcutaneously to mice. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18, 385-87.
- Brown, S. A., Jaglan, P. S., & Banting, A. (1991). Ceftiofur sodium: Disposition, protein-binding, metabolism, and residue profile in various species. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 87, 97-99.
- Budavari, S. (1996). *The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 12th Ed. Whitehouse Station/USA: Merck&Co. Inc.
- Burrows, G. E. (1980). Pharmacotherapeutics of macrolides, lincomycins, and spectinomycin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176, 1072-77.
- Burrows, G. E., Barto, P. B., Martin, B., & Tripp, M. L. (1983). Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin and tylosin. *American Journal Veterinary Research*, 44, 1053-57.
- Cazeau, G., Botrel, M., Sala, C., Chazel, M., Jarrige, N., & Calavas, D. (2009). Motivations of antibiotic prescriptions by cattle veterinarians and user recommendation adequacy: Results of the AfssaSNGTV survey in France. *The Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 49, 61-65.
- Cengiz, M. (2010). Bakterilerde kinolon direncinin genetiği. *Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 29(1), 55-60.
- Cester, C. C., Ganierieb, J. B., & Toutainc, P. L. (1993). Effect of stage of æstrous cycle on tylosin disposition in genital tract secretions of cows. *Research in Veterinary Science*, 54(1), 32-39.
- Cha'fer-Perica's, C., Maquieira, A., & Puchades, R. (2010) Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 1038-49.

- Chiffmann, A., Schütz, M., & Wiesner, H. U. (1992). False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. II: Factors influencing the Brilliant Black Reduction Test (BRT). *Milchwissenschaft*, 47, 770-72.
- Connolly, P., Prough, M. J., & Lesman, S. P. (2006). Determination of amoxicillin residues in bovine tissues after 5 i.m. injections of clamoxyl RTU (amoxicillin) at 7 mg/kg at 24-hour intervals. Unpublished report submitted to FAO by Pfizer Animal Health. Report 1531N-60-04-453.
- Coşkun, Y., Erdoğan, A. T., & Özdemir, G. (2012). Tavuk etinde antibiyotik kalıntılarının sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometresi ile çoklu kalıntı tarama analizi için metod geliştirilmesi. *Bornova Veteriner Bilimleri Dergisi*, 34(48), 17-30.
- Daeseleire, E., Vandeputte, R., & Van Peteghem, C., (1998). Validation of multi-residue methods for the detection of anabolic steroids by GC-MS in muscle tissues and urine samples from cattle. *Analyst Journal*, 123, 2595–98.
- Davis, J. L., Foster, D. M., & Papich, M. G. (2008). Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30, 564–71.
- De Craene, B. A., Deprez, P., D'Haese, E., Nelis, H. J., Van den Bossche, W., & De Leenheer, P. (1997.) Pharmacokinetics of florfenicol in cerebrospinal fluid and plasma of calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 1991–95.
- Demir, P. A., & Aydın, E. (2018). Hormon ve antibiyotik kullanımına ilişkin olumsuz haberlerin tüketicilerin tavuk eti tüketim alışkanlıklarına etkisi (Kars ili örneği). *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(1), 55-63. Doi: 10.24880/Maeuvfd.407906
- Demircioğlu, Y. (2004). Gıda güvenliği açısından pestisit kalıntıları. *Mesleki Eğitim Dergisi*, 6 (12), 101-12.
- Deshpande, S. S. (2002). *Handbook of Food Toxicology*. New York: Marcel Dekker Inc. pp: 865-77.
- Djebala, S., Croubels, S., Cherlet, M., Martinelle, L., Thiry, D., Moula, N., ... Philippe Bossaert. (2021). Description of plasma penicillin G concentrations after intramuscular injection in double-musled cows to optimize the timing of antibiotherapy for caesarean section. *Veterinary Sciences*, 8, 67.
- Donoho, A. L. (1988). Comparative metabolism of ¹⁴C tilmicosin in cattle and rats. *Lilly Research Study Report ABC-0395*.
- Donoho, A. L., Peloso, J. S., & Thomson, T. D. (1988). ¹⁴C tilmicosin tissue residue study in cattle. *Lilly Research Study Report ABC-038*.
- Dowling, P. M. (2013). Chapter 16: Chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol. Giguère, S., Prescott, J. F., MA, Dowling, P. M. (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5. edition). John Wiley & Sons, Inc.
- Duong, H. A., Pham, N. H., Nguyen, H. T., Hoang, T. T, Pham, H. V., Pham, V. C. ... Alder, A. C. (2008). Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere*, 72, 968–73.
- Duru, M., Şahin, A. 2011. Türkiye’de sağlıklı ve güvenli hayvansal üretimin gerekliliği: Entansif hayvancılığın insanlar üzerine olumsuz sonuçları. *Ordu’da Gıda Güvenliği* (Sayı 15). Erişim adresi: <https://ordu.tarimorman.gov.tr/Belgeler/G%C4%B1da%20Dergisi/sayı15.pdf>.
- EC (European Commission). (1993). Council Regulation (EEC) No 2901/93/EEC of the Council of 18 October 1993 on amending Annexes I, II, III and IV to Regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in food-stuffs of animal origin. The Official Journal of the European Union, L,264, 1–4.

EC (European Commission). (1996). Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC.

EC (European Commission). (1998). Council Regulation (EEC) No 2821/98 of 17 December 1998 amending, as regards withdrawal of the authorisation of certain antibiotics, Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. The Official Journal of the European Union, L15,1.

EC (European Commission). (2003). Regulation (EC) No: 1831/2003 of The European Parliament and of The Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Official Journal of the European Union.

EC (European Commission). (2005). Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. Erişim adresi: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687. Erişim Tarihi: 20.09.2021.

EC (European Commission). (2010). Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. The Official Journal of the European Union, L15,1.

EMA (European Medicines Evaluation Agency). (1994). Chloramphenicol: Summary Report. Committee For Veterinary Medicinal Products: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/chloramphenicol-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf

EMA (European Medicines Evaluation Agency). (1996). Florfenicol: Summary Report (1). Committee for Veterinary Medicinal Products: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit.

EMA (European Medicines Evaluation Agency). (1997a). Tylosin: Summary Report (3). Committee for Veterinary Medicinal Products: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMA/MRL/205/97.

EMA (European Medicines Evaluation Agency). (1997b). Tilmicosin: Summary Report (1). Committee for Veterinary Medicinal Products: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit.

EMA (European Medicines Evaluation Agency). (1998). Enrofloxacin: Summary Report (2). Committee for Veterinary Medicinal Products: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMA/MRL/388/98-FINAL.

EMA (European Medicines Evaluation Agency). (1999a). Ceftiofur: Summary Report (2). Committee For Veterinary Medicinal Products: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMA/MRL/498/98-FINAL.

EMA (European Medicines Evaluation Agency). (1999b). Florfenicol: Extension to pigs, Summary Report (4). Committee For Veterinary Medicinal Products: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMA/MRL/591/99-FINAL.

EMA (European Medicines Evaluation Agency). (2008). Penicillins: Summary Report (1). Committee For Veterinary Medicinal Products: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit.

Er, B., Onurdağ, F. K., Demirhan, B., Ozgacar, S., Oktem, A. B., & Abbasoglu, U. (2013). Screening of quinolone antibiotic residues in chicken meat and beef sold in the markets of Ankara, Turkey. *Poultry Science*, 92(8), 2212-15.

ESVAC (The European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) Report. (2015). Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2013 Fifth ESVAC report. EMA/387934/2015 Veterinary Medicines Division.

FAO/WHO (2018). Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. Codex Alimentarius Commission International Food Standards. CX/MRL 2-2018.

FEDESA (European Federation of Animal Health). (2001). Antibiotic use in farm animals does not threaten human health. Sweden: FEDESA Press release.

Fernandez, C., Modamio, P., Mestorino, N., Errecalde, J. O., & Mariño, E. L. (2007). Pharmacokinetics of sodium and trihydrate amoxicillin in sheep after intravenous and intramuscular administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(3), 263-66. doi: 10.1111/j.1365-2885.2007.00843.x. PMID: 17472659.

Filazi, A. (2012). Hayvansal gıdalardaki antibiyotik kalıntıları ve risklerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 3(3), 1-7.

Flamm, R. K. (2010). The challenge of antimicrobial resistance in human health. *JMI Laboratories*, Iowa/ USA, 1-36.

Fourtillan, J. B., & Dubourq, D. (1982). Pharmacocinetiques sanguine et tissu laire de l'oxytetracycline apres administration de la terramycine longue action chez la vache. (Pharmacokinetics of long-acting terramycin in cattle). *Pharmacologic et Toxicologie Veterinaires*, 8, 133-34.

Garay, J. B. (1997). Clenbuterol poisoning: Clinical and analytical data on an outbreak in Mostoles, Madrid. *Revista Clínica Española*. 197, 92-95.

Geis-Asteggiate, L., Lehotay, S. J., Lightfield, A. R., Dutko, T., Ng C., & Bluhm, L. (2012). Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1258, 43-54.

Giera, D. D. & Peloso, J. S. (1988). Characterization of radioactive residues in cattle tissues following therapeutic dose of I4C EL-870. *Lilly Research Study Report ABC-0353*.

Giera, D. D., Herberg, J. R., & Thomson, T. D. (1987). 14C EL-870 balance excretion and tissue residue study in a steer. *Lilly Research Study Report ABC-0299*.

Giera, D. D., Herberg, J. R., Klink, P. R., & Thomson, T. D. (1986). I4C EL-870 tissue residue decline study and balance-excretion study in cattle. *Lilly Research Study Report ABC-0340*

Gilliam, J. N., Streeter, R. N., Papich, M. G., Washburn, K. E., & Payton, M. E. (2008). Pharmacokinetics of florfenicol in serum and synovial fluid after regional intravenous perfusion in the distal portion of the hind limb of adult cows. *American Journal of Veterinary Research*, 69, 997-1004.

Gingerich, D. A., Baggot, J. D., & Kowalski, J. J. (1977). Tylosin antimicrobial activity and pharmacokinetics in cows. *Canadian Veterinary Journal*, 18(4).

Gorbach, S. L. (1993). Perturbation of intestinal microflora. *Veterinary and Human Toxicology*, 35, 15.

Gutiérrez, L., Soriano, R., Martínez-Cortes, I., Miranda-Calderon, J. & Sumano, H. (2016). Pharmacokinetics of a new parenteral formulation of tilmicosin-la in cows. *Pakistan Veterinary Journal*, 36(2), 165-68.

Guzman, A., Garcia, C., Marin, A. P., Willoughby, C., & Demestre, I. (2003). Developmental toxicity studies of the quinolone antibacterial agent irloxacin in rats and rabbits. *Arzneimittelforschung*, 53, 121-25.

Hamann, J., Tolle, A., & Hesscheu, W. (1979). Antibiotic and sulfonamides. *International Dairy Federation Bulletin*, 113, 43.

- Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 358-73.
- Hwang, Y. H., Kim, M. S., Song, I. B., Lim, J. H., Park, B. K., & Yun, H. I. (2009). Altered pharmacokinetics of enrofloxacin in experimental models of hepatic and renal impairment. *Veterinary Research Communications*, 33, 481-87.
- Idowu, O. R., Peggins, J. O., Cullison, R., & von Bredow, J. (2010). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Research in Veterinary Science*, 89, 230-35.
- İnce, S., & Filazi, A., (2007). Bağlı kalıntılar. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 7, 79-85.
- Jaglan, P. S., Kubicek, M. F., Arnold, T. S., & Cox, B. L. (1989). Metabolism of ceftiofur. Nature of urinary and plasma metabolites in rats and cattle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1112-18.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). (1990). Residues of some veterinary drugs in animals and foods. FAO Food and Nutrition Paper, No 41/3. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Erişim adresi: <http://www.fao.org/3/T0459E/T0459E.pdf>. Erişim tarihi: 20/09/2021.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). (2009). Online edition: Residues of some veterinary drugs in foods and animals. FAO Food and Nutrition Paper 41/4. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Erişim adresi: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-vetdrugs/details/en/c/89/> Erişim tarihi: 20/09/2021.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). (2011). Residue evaluation of certain veterinary drugs. 75th Meeting. FAO JECFA Monographs 12. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Erişim adresi: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/JECFA_Monograph_12.pdf. Erişim tarihi: 20/09/2021.
- Joseph, D. C., Moellering, Y., & Moellering, R. C. (2003). Antibacterial agents. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C., & Tenover, R.H. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (8th edition). ASM Press, 1039-73.
- Kaartinen, L., Salonen M., Alli L., & Pyörala, S. (1995). Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *The Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18, 357-62.
- Kabadayı, B. (2014). *Alabalıklarda (Oncorhynchus mykiss) hasat öncesi ve hasat dönemi yenilebilir doku örneklerinde florokinolon grubu antibiyotiklerden enrofloksasin kalıntılarının araştırılması*. [Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü].
- Kanfer, I., Skinner, M. F., & Walker, R. B. (1998). Review: Analysis of macrolide antibiotics. *Journal of Chromatography A*, 812, 255-86.
- Kater, A. (2006). *Türkiye’de ruhsatlı normal ve uzun etkili oksitetrasiklin müstahzar prospektüslerinin farmakokinetik ve farmakodinamik bilgiler yönünden incelenmesi*. [Tezsiz yüksek lisans dönem projesi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü].
- Katz, S. E., & Brady, M. S. (2000). Antibiotic residues in food and their significance. *Food Biotechnology*, 14(3), 147-71.
- Kaya, S. (1994). Antibiyotikler. Şanlı, Y., & Kaya, S. (Eds.), *Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağlıkta Seçenekleri* (2. Baskı) (s. 571-647). Ankara: Medisan Yayınevi.
- Kaya, S. (2000). Beta-laktamlar. Kaya, S., Pirinççi, İ., & Bilgili, A. (Eds.), *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji* (3. baskı) (s. 269-321). Ankara: Medisan Yayınevi.

- Kaya, S. (2002). Antibiyotikler. Kaya, S., Pirinçci, İ., & Bilgili, A. (Eds.), *Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji* (3. baskı) (s.267-423). Ankara: Medisan Yayınevi.
- Kaya, S. (2018). Drug residues in animal foods and consumer safety. *International Journal of Scientific and Technological Research*. 4(8), 28-37.
- Kaya, S. (Ed.) & Ünsal, A. (2013). Besinlerde İlaç Kalıntıları. *Veteriner Farmakoloji* (5. baskı) (s.701-28). Ankara: Medisan Yayınevi.
- Kaya, S., Ünsal, A., (2000). Besinlerdeki ilaç kalıntıları. Şanlı, Y., & Kaya, S. (Eds.), *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji* (2. baskı) (s.699-711). Ankara: Medisan Yayınevi.
- Kaya, S., Yarsan, E., Baydan, E., Bilgili, A., & Şeker, Y. (1996). Etlik piliçlerde enrofloksasinin farmakokinetiği ve manganla enrofloksasin arasında emilme yönünden etkileşme. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 43, 195-202.
- Kaya, S., Yavuz, H., Akar, F., Liman, B. C., & Filazi, A., (1992). Mezbahadan sağlanan sığır et, karaciğer ve böbrek örneklerinde antibiyotik kalıntıları. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 39(2), 13-29.
- Kayaalp, O. (1991). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* (6. Baskı) (s.826-63). Ankara: Feryal Matbaacılık.
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8, 1–13.
- Kılıç, A. S. (2017). *Bursa’da satışı sunulan dana ve piliç etlerinde farklı grup anabolizan ve antimikrobiyal kalıntılarının araştırılması*. [Yayınlanmış yüksek lisans tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü].
- Kim, S., & Aga, D. S. (2007). Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 10, 559-73.
- Kools, S. A. E., Moltmann, J. F., & Knacker, T. (2008). Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50, 59–65.
- Korsrud, G. O., Boison, J. O., Papich, M. G., Yates, W. D. G., MacNeil, J. D., Janzen, E. D. ... Messier, J. R. (1993). Depletion of intramuscularly and subcutaneously injected procaine penicillin G from tissues and plasma of yearling beef steers. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57, 223-30.
- Korsrud, G. O., Boison, J. O., Papich, M. G., Yates, W. D., MacNeil, J. D., Janzen, E. D. ... Yong, M. S. (1994). Depletion of penicillin G residues in tissues and injection sites of yearling beef steers dosed with benzathine penicillin G alone or in combination with procaine penicillin G. *Food Additives and Contaminants*, 11(1), 1-6.
- Krzeminski, L. F., Stuart, D. J., Gosline, R. E., Subacz, C. J., Cox, B. L., & Reeves, D. R. (1985). HPLC assay of bovine plasma and urine metabolites after treatment with Carbon 14 labeled ceftiofur. *The Upjohn Company*: TR 788-9760-85-005.
- Kumar, P. (2017). Pharmacology of specific drug groups. *Antibiotic Therapy*. 33.
- Kümmerer, K. (2001). Drugs in environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources-a review. *Chemosphere*. 45, 957-69.
- Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotography*, 52(1), 5-7.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment-a review-part I-II. *Chemosphere*. 75, 417-41.
- Küng, K. J. (1993). Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology*, 16, 462-78.

- Landoni, M. F., & Errecalde, J. O. (1992). Tissue concentrations of long-acting oxytetracycline formulation after intramuscular administration in cattle. *Revue scientifique et technique*, 11(3), 909-15.
- Lee, Y. J., Cho, J. K., Kim, K. S., Tak, R. B., Kim, A. R., Kim, J. W. ... Kim, B.H., (2005). Fluoroquinolone resistance and gyrA and parC mutations of Escherichia coli isolated from chicken. *Journal of Microbiology*, 43(5), 391-97.
- Lemus, J. A., Blanco, G., Grande, J., Arroyo, B., & Garcia-Montijano, M. (2008). Antibiotics threaten wildlife: Circulating quinolone residues and disease in avian scavengers. *PLoS ONE*, 7(10), 10.
- Li, X., Zheng, W., Machesky, M. L., Yates, S. R., & Katterhenry, M. (2011). Degradation kinetics and mechanism of antibiotic ceftiofur in recycled water derived from a beef farm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 10176-81.
- Lin, Z., Vahl, C. I., & Riviere, J. E. (2016). Human food safety implications of variation in food animal drug metabolism. *Scientific Reports*, 6, 27907.
- Lobell, R. D., Varma, K. J., Johnson J. C., Sams, R. A., Gerken D. F., & Ashcraft, S. M. (1994). Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 17(4), 253-58.
- Lohani, M., Ahmad, A. H., Singh, K. P., & Verma, S. (2010). Pharmacokinetics and residual studies of florfenicol following multiple dose oral administration in poultry. *Journal of Applied Animal Research*, 38, 9-12.
- Loke, M. L., Ingerslev, F., Halling-Sorensen, B., & Tjornelund, J. (2000). Stability of tylosin a in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*, 40, 759-65.
- Lombardi, K. R., Portillo, T., Hassfurther, R., & Hunter, R. P. (2011). Pharmacokinetics of tilmicosin in beef cattle following intravenous and subcutaneous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34, 583- 87.
- Lucas, J. J., San Andrés, M. I., González, F., Froyman, R. & Rodríguez C. (2008). Pharmacokinetic behaviour of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *Veterinary Research Communications*, 32, 275-79.
- Luthman, J., Jacobsson, S. O. (1982). A comparison of two oxytetracycline formulations in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 23, 147-49.
- Martinez, J. F. (1990). Food poisoning related to consumption of illicit β -agonist in liver. *Lancet*, 336(8726), 1311.
- McKellar, Q. (1996). Clinical relevance of the pharmacologic properties of fluoroquinolones. *Education Practicing Veterinarian*, 18, 14-20.
- McKellar, Q., Gibson, I., Monteiro, A., & Bregante, M. (1999). Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudates, bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 1988-92.
- Meiszberg, A., Karriker, L., Zimmerman, J., Irwin, C., & Coetzee, J. (2011). Detection of ceftiofur and oxytetracycline in oral fluids of swine with a pen-side competitive ELISA test after intramuscular injection. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34(5), 515-17.
- Mengozi, G., Intorre, L., Bertini, S., Giorgi, M., Secchiari, P., & Soldani, G. (2002). A comparative kinetic study of thiamphenicol in pre-ruminant lambs and calves. *Research in Veterinary Science*, 73(3), 291-95.
- Mitchell, J., Griffiths, M., & McEwen, S. (1998). Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *Journal of Food Protection*, 61(6), 742-56.

- Mitchell, M. A. (2006). Therapeutic review enrofloxacin. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 15(1), 66-69.
- Modric, S. (1997). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of tilmicosin in sheep, cattle, and rats*. USA: UMI Company.
- Nägele, E., & Moritz, R. (2005). Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap ms(n) and accurate mass determination by ESI TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16, 1670-76.
- Nouws, J. F. M., Vree, T. B., Termond, E., Lohuis, J., van Lith, P., Binkhorst, G. J. & Breukink, H. J. (1985). Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline after intravenous and intramuscular administration to dairy cows. *Veterinary Quarterly*, 7(4), 296-305.
- Nouws, J. F. M. (1982). Comparative plasma oxytetracycline levels of a "long acting" and a normal oxytetracycline formulation in ruminant calves. *Pharmacologie et Toxicologie Veterinaires*, 8, 195-98.
- Nouws, J. F. M., & Ziv, G. (1977). Tissue distribution and residues of tylosin in normal and emergency-slaughtered dairy cows and calves. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 28, 92-94.
- Nouws, J. F. M., & Ziv, G. (1978a). Tissue distribution and residues of oxytetracycline in normal and emergency-slaughtered ruminants. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 103(8), 535-44.
- Nouws, J. F. M., & Ziv, G. (1978b). A kinetic study of beta-lactam antibiotic residues in normal dairy cows. *Zentralbl Veterinarmed A*, 25(4), 312-26.
- Nouws, J. F. M., & Ziv, G. (1979). Distribution and residues of macrolide antibiotics in normal dairy cows. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 30, 202-08.
- Nouws, J. F. M., Guelen, P., Mevius, D., & Driessens, F. (1986). Age difference in pharmacokinetics of an amoxicillin trihydrate-15% formulation administered intramuscularly to ruminants. *Veterinary Quarterly*, 8, 339-42. <https://doi.org/10.1080/01652176.1986.694065>.
- Okerman, L., Van Hoof, J., & Debeuckelaere, W. (1998). Evaluation of the european four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 81, 51-56.
- Oliphant C. M., & Green, G. M. (2002). Quinolones: A comprehensive review. *American Academy of Family Physicians*, 65, 455-64.
- Olson, S. C., Beconi-Barker, M. G., Smith, E. B., Martin, R. A., Vidmar, T. J., & Adams, L. D. (1998). In vitro metabolism of ceftiofur in bovine tissues. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 21, 112-20.
- Oruç, H. H., Cengiz, M., Bağdaş, D., & Uzunoğlu, İ. (2007). Sığır etlerinde streptomisin ve sulfametazin (sulfadimidin) kalıntıları, *Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 26 (1-2), 17-20.
- Oruç, H. H., Rumbelha, W. K., Ensley, S., Olsen, C., & Schrunck, D. E. (2013). Simultaneous detection of six different groups of antimicrobial drugs in porcine oral fluids using a biochip array-based immunoassay. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(3), 407-12.
- Ozansoy, F. A. (2013). *Klinik materyallerden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarında makrolid, linkozamid ve streptogramin b direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması*. [Yayınlanmış tıpta uzmanlık tezi, Denizli].
- Öncül, O. (2002). Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar. *Antibiyotikler I. Sempozyum Dizisi* No: 31, 23-38.
- Özdemir, E. (2010). *Gökkuşluğu alabalıklarında (Oncorhynchus Mykiss-Walbaum 1792) bazı antibiyotik kalıntılarının saptanması*. [Yayınlanmış yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü].

- Özdemir, Z., Traş, B. (2018). Sütte antibiyotik kalıntılarının belirlenmesinde kullanılan hızlı test kitleri ve güvenilirlikleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11(1), 48-54.
- Özdemir, Z., Traş, B., Üney, K., Faki, H. E., & Beşoluk, T. M. (2019). Determination of milk/plasma ratio and milk and plasma pharmacokinetics of amoxicillin after intramuscular administration in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42, 45-51.
- Özen, A., Yüksel, E., & Doğan, Ö. (2010). Veteriner ilaçları satış yetkisinin veteriner hekimliği açısından değerlendirilmesi: III. ilaç satış yetkisi ile kalıntılar arasındaki ilişki. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(5), 819-23.
- Papich, M. G. (2016). Penicillin G. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs* (4th edition) (pp. 613-16). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00443-5>. Erişim tarihi: 20/09/2021.
- Park, J. Y., Awji, E. G., Suh, J. W., & Park, S. C. (2016). Pharmacokinetics, pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship, and withdrawal period of amoxicillin sodium in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Xenobiotica*, 46(6), 522-29.
- Parlar, A., & Kaya, S. (2005). Etlik piliçlerde enrofloksasin içeren müstahzarların farmakokinetiği. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 52, 99-103.
- Pavlov, A., Lashsev, L., & Rusev, V. (2005). Studies on the residue levels of tobramycin in stored poultry products. *Trakia Journal of Sciences*, 3(5), 20-22.
- Poirier, L. A., Doerge, D. R., Gaylor, D. W., Miller, M. A., Lorentzen, R. J., D. A., Kadlubar, F. F., & Schwetz B. A. (1999). An FDA review of sulfamethazine toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30, 217-22.
- Polak, B. C. P., Wesseling, H., Schut, D., Herxheimer, A., & Meyler, L. (1972). Blood dyscrasias attributed to chloramphenicol: a review of 576 published and unpublished cases. *Acta Medica Scandinavica*, 192, 409-14.
- Prats, C., El Korchi, G., Francesch, R., Arboix, M., & Pere, B. (2002). Disposition kinetics of tylosin administered intravenously and intramuscularly to pigs. *Research in Veterinary Science*, 73, 141-44.
- Prescott, J. F. (2000). Tetracyclines. In Prescott, J. F., Baggot, J. D., & Walker, R. D. (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (3rd edition) (pp: 275-89). Ames (IA): Iowa State University Press.
- Pulce, C. (1991). Collective human food poisoning by clenbuterol residues in veal liver. *Veterinary and Human Toxicology*, 33, 480-81.
- Radford, D., Strange, P., Lepp, D., Hernandez, M., Rehman, M. A., Diarra, M. S., & Balamurugan, S. (2018). Genomic and proteomic analyses of *Salmonella enterica* serovar enteritidis identifying mechanisms of induced de novo tolerance to ceftiofur. *Frontiers in Microbiology*, 10(9), 2123.
- Ramadan, A. (1997). Pharmacokinetics of tilmicosin in serum and milk of goats. *Research in Veterinary Science*, 62, 48-50.
- Randox Kullanım Kitapçığı. (2016). Antimikrobiyal Array II (AM II) EV 3524; Beta Latam Array (BLACT) EV 3793.
- Rao, G. S., Ramesha, S., Ahmadb, A. H., Tripathia, H. C., Sharmab, L. D., & Malik, J. K. (2002). Disposition kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin following intravenous administration of enrofloxacin in goats. *Small Ruminant Research*, 44, 9-15.
- Reyns, T., De Boever S., De Baere, S., De Backer, P., & Croubels, S. (2008). Tissue depletion of amoxicillin and its major metabolites in pigs: Influence of the administration route and the simultaneous dosage of clavulanic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 448-54.
- Ruhoy, I. S., & Daughton, C. G. (2008). Beyond the medicine cabinet: An analysis of where and why medications accumulate. *Environment International*. 34, 1157-69.

- Salleras, L. (1995). Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Reports*, 110, 338-42.
- Salmon, S. A., Watts, J. L., & Yancey, R. J. (1996). In vitro activity of ceftiofur and its primary metabolite, desfuroylceftiofur, against organisms of veterinary importance. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(3), 332-36.
- Sams, R. A. (1994). Florfenicol: Chemistry and metabolism of a novel broad-spectrum antibiotic. *Proceedings of the XVIII World Buiatrics Congress*, Bologna Italy, 13-17.
- Saran, B., Karahan, Z. C. (2010). Ürolojide antibiyotik kullanımı: Antimikrobiyal ajanlara genel bakış. *Türk Üroloji Seminerleri*, 1, 216-20.
- Sarı, H. (2005). *Karbapenemlere dirençli gramnegatif basil izolatlarında İmipenem-EDTA / Meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye Hodge Testi ile metallo-beta-laktamaz (mbl) varlığının araştırılması*. [Yayınlanmış tıpta uzmanlık tezi, İstanbul].
- Schenck, F. J., & Callery, P. S. (1998). Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of Chromatography A*, 812(12), 99-109.
- Sidhu, P., Illambas, J., Potter, T. J., Rycroft, A. N., Lees, P. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of florfenicol in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32, 67-68.
- Singh, S., Shukla, S., Tandia, N., Kumar, N., & Paliwal R. (2014). Antibiotic residues: A global challenge. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 184-97.
- Sivapalasingam, S., & Steigbigel, N. H. (2010). Macrolides, clindamycin, and ketolides. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases* (7th edition) (pp.427-48). Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.
- Smith, T. A. & Moore, G. W. (1976). Tissue residue protocol. Trial 106. Ruminating calves. Unpublished report submitted to FAO by the U.S. Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. Beecham Research Laboratories, Surrey, England.
- Soback, S., Paape, M. J., Filep, R., & Varma, K. J. (1995). Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18, 413-17.
- Sporano, V., Grasso, L., Esposito, M., Oliviero, G., Brambilla, G., & Loizzo, A. (1998). Clenbuterol residues in non-liver containing meat as a cause of collective food poisoning. *Veterinary and Human Toxicology*, 40(3), 141-43.
- Stein, G. E. (1991). Drug interaction with fluoroquinolones. *American Journal of Medicine*, 91(6), 81-86.
- Stolker, A. A. M., & Brinkman, U. A. T. (2005), Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals. *Journal of Chromatography A*, 1067, 15-53.
- Swartz, M. N. (2002). Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 111-22.
- Şanlı, Y., & Kaya, S. (1991). Antibiyotikler. *Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağlık Seçenekleri*, (s.567), Ankara: Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd.Şti.
- Şanlı, Y., & Kaya, S. (1994). *Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağlık Seçenekleri*. Ankara: Medisan Yayınevi, 571-650.
- Şanlı, Y., Filazi, A., & Kum, C. (1997). Veteriner hekimlikte klinik farmakokinetik. *Veteriner Hekimlik Derneği Dergisi*, 68, 60-9.
- Şener, S. (1990). *Veteriner Klinik Farmakoloji ve Formüller*. Gebze-Kocaeli: Pethask Veteriner Hekimliği Yayınları.
- Şener, S. (2006). Özel Farmakoloji. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, Yayın No: 4671, ISSN 975- 404-770-7 s.174-176.
- Şener, S., & Yıldırım, M. (2002). Hayvanlarda antibiyotik kullanımı ve insan sağlığıyla ilgili sonuçları. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 16(4), 416-22.

- Tannock, G. W. (1998). Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. *International Dairy Journal*, 8, 527-33.
- Taşova, Y. (2010). Tetrasiklinden tigesikline. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*, 24(Ek 2), 36-4.
- Teeter, J. S., & Meyerhoff R. D. (2003). Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental Research*, 93, 45-51.
- TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2003). Gıda Değeri Olan Hayvanlara Uygulanması Yasaklanan ve Belli Şartlara Bağlı Hormon ve Benzeri Maddeler Hakkında Tebliğ. (2003, Haziran 19). Resmi Gazete (Sayı: 25143).
- TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2006). Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ. (2006, Ocak 21). Resmi Gazete (Sayı:2656).
- TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2011a). Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik. (2011, Aralık 17) Resmi Gazete (Sayı: 28145).
- TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2011b). Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik. (2011, Aralık 24) Resmi Gazete (Sayı: 28152).
- TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2013). Hayvan Beslemede Kullanılan Yem Katkı Maddeleri Hakkında Yönetmelik. (2013, Temmuz 18). Resmi Gazete (Sayı: 28711).
- TGK (Türk Gıda Kodeksi). (2017). Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. Resmi Gazete, (201, Mart 17). Resmi Gazete (Sayı: 30000).
- Thomson, T. D. & Peloso, J. S. (1989) Serum and lung tilmicosin levels in feedlot-type cattle following a single 10 mg/kg subcutaneous injection with the bovine parenteral formulation. *Research Report T5C768902*.
- Thomson, T. D. (1989). Serum tilmicosin profiles following a single 10 mg/kg administration of the proposed tilmicosin bovine parenteral formulation feedlot-type cattle in several anatomical sites. *Research Report T5C768805*.
- Tinkelman, D. G. & Bock, A. (1984). Anaphylaxis presumed to be caused by beef containing streptomycin. *The Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 53, 241-43.
- Topal, M., Şenel, G. U., Topal, E. I. A., & Öbek, E. (2015). Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31(3), 1-6.
- Toutain, P. L. & Raynaud, J. P. (1983). Pharmacokinetics of oxytetracycline in young cattle: Comparison of conventional vs long-acting formulations. *American Journal of Veterinary Research*, 44(7), 1203-09.
- Trouchon, T., & Lefebvre S. (2016). A review of enrofloxacin for veterinary use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6(2), 40-58.
- Tschevschner, I. (1972). Penicillin anaphylaxis following pork consumption. *Zeitschrift für Haut- und Geschlechtskrankheiten*, 47, 591.
- Tuncer, H. İ. (2007). Karma yemlerde kullanımı yasaklanan hormon, antibiyotik, antikoksidyal ve ilaçlar. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47(1), 29-37.
- TÜBA (Türkiye Bilimler Akademisi). (2017). TÜBA-İnsan ve hayvan sağlığında akılcı antibiyotik kullanımı ve antibiyotik dirençlilik raporu. Şahin K. (Ed.). Türkiye Bilimler Akademisi Yayınları. Ankara: Ses Reklam Matbaacılık.
- Uğur, M., Nazlı, B., & Bostan, K. (1999). *Gıda Hijyeni*. İstanbul: Teknik Yayınları.
- Ungemach, F. R. (2000): Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 93, 89-98.
- Van Den, B. A., & Stobberingh, E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327-35.

- Van Duyn, R. L. & Folkerts, T. M. (1979). Concentrations of tylosin in blood and lung tissue from calves given single and repeated daily intramuscular doses. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician*, 74, 375-77.
- Vancutsem, P. M., Babish, J. G., & Schwark, WS. (1990). Structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *The Cornell Veterinarian*, 80, 173-86.
- Varma, K. J., Adams, P. E., Powers, T. E., Powers, J. D. & Lamendola, J. F. (1986) Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 9, 412-25.
- VİSAD (Veteriner ilaç sanayi alt çalışma grubu). (2006). IX. Kalkınma planı ilaç sanayi özel ihtisas komisyonu. Veteriner ilaç sanayi alt çalışma grubu raporu.
- Walker, R. D., Stein, G. F., Hauptman, J. G., & Macdonald, K. H. (1992). Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin administered orally to healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 2315-19.
- Wang, Z., Yang, H., Sun, W., Huang, C., Cui, X., Qiu, X., Lian Q., & Wang, Z. (2014). UPLC-MS/MS determination of thiamphenicol in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 967, 235-39.
- Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 439-45.
- World Health Organization (WHO). (2011). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe World Health Organization 2011. ISBN 978 92 890 1422 9.
- Yan, Z., Huang, X., Xie, Y., Song, M., Zhu, K., & Ding, S. (2019). Macrolides induce severe cardiotoxicity and developmental toxicity in Zebrafish embryos. *Science of the Total Environment*, 649, 1414-21.
- Yarsan, E. (2018). Derleme: Veteriner ilaçları ve ilaçtan kaynaklanan sorunlar. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 58 (Özel Sayı) 64-68
- Yarsan, E. (Ed.). (2013). *Veteriner hekimlikte antibiyotikler (Pratik Bilgiler Rehberi)*. Ankara: Güneş Kitabevi. ISBN: 978-975-277-510-7.
- Yarsan, E., & Pehlivan, S. (2000). Veteriner hekimlikte etiket dışı ilaç kullanımı: Antimikrobiyal ilaçlar. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 11(3), 134-50.
- Yasmeen, S., & Rabbani, G. (2017). Calorimetric and spectroscopic binding studies of amoxicillin with human serum albumin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 127, 1445-55. <https://doi.org/10.1007/0973-016-5555->
- Yein, F. S., Zaya, M. J., Arnold, T. S., Hoffman, G. A., Roof, R. D., Dame, K. J., ... Flook, T. F. (1990). Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ¹⁴C-Ceftiofur (u-64,279e) sodium in the swine. *The Upjohn Company*: TR 796-9760-89-002.
- Yıbar, A. (2011). *Bursa'da tüketime sunulan tavuk göğüs eti, but eti ve karaciğerinde bazı antibiyotik kalıntılarının araştırılması*. [Yayınlanmış doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü].
- Yıbar, A., Soyutemiz, E. (2013). Gıda Değeri Olan Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı ve Muhtemel Kalıntı Riski. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*, 8(1), 97-104.
- Yıldırım, M. (1993). *Kanatlarda kollektif uygulamadan sonra kloramfenikol'ün yumurtaya transferi ve İstanbul'da tüketilen yumurtalarda kloramfenikol rezidüleri üzerine araştırmalar*. [Yayınlanmış doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü].
- Yılmaz, E. (2017). *Antibiyotikler güncel durum özel sayısı: kinolonlar*. *Türkiye Klinikleri Infectious Diseases - Special Topics Journal*, 10(1), 99-105.
- Yılmaz, G. R. (2013). Tetrasiklinden tigesikline. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*, 27, 118-23.

- Yüksek, N. (2000). Etilerde antibiyotik kalıntılarının aranması üzerinde çalışmalar. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 20, 85-90.
- Ziv, G., & Sulman F. G. (1973). Serum and milk concentrations of spectinomycin and tylosin in cows and ewes. *American Journal of Veterinary Research*, 34(3), 329-33.
- Ziv, G., Shem-Tov, M., Glickman, A., Winkler, M., & Saran, A. (1995) Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18, 340-45.
- Zuccato, E., Castiglioni, S., & Fanelli, R. (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian Aquatic Environment. *Journal of Hazardous Materials*, 122, 205-09.
- Zuckerman, J. M., Qamar F., & Bono, B. R. (2009). Macrolides, ketolides, and glycylicyclines: azithromycin, clarithromycin, telithromycin, tigecycline, *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(4), 997-1026.

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

A

AB: Avrupa Birliği
ABD: Amerika Birleşik Devletleri
AM-II: Antimicrobial Array II
AMX: Amoksisilin

B

BLACT: Beta Laktam Array

C

CEF: Seftiofur
CSB: Column Storage Buffer
CWB: Column Wash Buffer

D

DCEF: Desfuroylseftiofur
DDS: Double Deionize Su
DIL ASY: Assay Dilüent
DIL CONJ: Dilüent Conjugat
dk: Dakika

E

EC: Avrupa Komisyonu (European Commission)
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assays
EMA: Avrupa İlaç Değerlendirme Kurumu (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)
ENR: Enrofloksasin

F

FAO: Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organisation)
FDA: Besin ve İlaç İdareesi (Food and Drug Administration)
FFC: Florfenikol

G

g: Gram
GC-MS: Gas chromatography mass spectrometry

H

HPLC-DAD: High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector

J

JECFA: Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)

K

kg: Kilogram

L

L: Litre
LA: Long action
LC-MS: Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

M

mg: Miligram
MKL: Maksimum Kalıntı Limiti
µg: Mikrogram
µl: Mikrolitre
ml: Mililitre
MRL: Maximum Residue Limit

O

OTC: Oksitetrasiklin

P

PEN G: Penisilin G

ppb: Milyonda bir (parts per billion)

R

rfc: Relatif santrifüj kuvveti (relative centrifugal force)

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı (rounds per minute)

S

sn: Saniye

°C: Santigrat derece

T

TGK: Türk Gıda Kodeksi

TM: Tilmikosin

TYL: Tilosin

U

USDA: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (United States Department of Agriculture)

W

WB: Wash Buffer

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

WSC: Working Strength Conjugate

WSR: Working Signal Reagent

WSWB: Working Strength Wash Buffer

8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ başta olmak üzere, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Songül SONAL'a ve Sayın Doç. Dr. Murat CENGİZ'e çok teşekkür ederim.

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Doping Laboratuvarı Sorumlusu Sayın Erol Kabil'e çalışmama gösterdikleri destek ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarında bana yardımcı olan, her türlü manevi destekte bulunup yol göstericilik yapan Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Ali SORUCU'ya, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım dönem arkadaşlarım Sena KILIÇ ve Ramadhani NYANDWI'ye, aynı odayı paylaştığım doktora öğrencisi Gülçe CENGİZ ve Elif KAYA'ya, teşekkür ederim.

Önümdeki tüm yolları aydınlatan annem Remziye ÇELİK'e,
Arkamdaki en büyük dayanağım olan babam Faruk ÇELİK'e,
Tüm yolları birlikte omuzladığım ablam Melike GÜNERTÜRK'e
İlham kaynağım, kızım Ahu Cemre ÇAYCI'ya
ve
Sevgili eşim Emre ÇAYCI'ya
hayatıma kattıkları güzellikler için çok teşekkür ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

Ben Meltem Çaycı. 2021 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimimi tamamladım.

Doktora eğitimim süresince;

"Bazı Antimikrobiyal İlaç Kalıntılarının Dana ve İneklerin Kesim Öncesi Biyolojik Örneklerinde (ağız sıvısı, dışkı, kan) ve Kesim Sonrası Bazı Dokularında Biochip Array Tekniği ve HPLC ile Karşılaştırmalı Belirlenmesi" isimli ÜSİP (V)-2014/8 no'lu BAP Üniversite ve Sektör İşbirliği Projesinde araştırmacı olarak,

TÜBİTAK/214O316 no'lu "*Escherichia coli*'de Çoklu İlaç Direncinin (MDR) Karakterizasyonu ve MDR'ın Antimikrobiyal Kombinasyonlarla İnhibisyonu" isimli projede bursiyer olarak yer aldım.