

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİĞİRLARA PARENTERAL YOLLA UYGULANAN  
BAZI MAKROLİD GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN  
SÜTTEKİ SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Tülay AVCI**  
**DOKTORA TEZİ**

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Muammer ELMAS**

**Konya – 2010**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİĞİRLARA PARENTERAL YOLLA UYGULANAN  
BAZI MAKROLİD GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN  
SÜTTEKİ SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Tülay AVCI**

**DOKTORA TEZİ**

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Muammer ELMAS**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (proje numarası 08202007) ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Gıda ve Yem Araştırmaları Daire Başkanlığı tarafından (proje numarası TAGEM/GY/09/03/01/163) desteklenmiştir.

**Konya - 2010**

## ÖNSÖZ

Dünya antibakteriyel ilaç pazarının 100.000 ile 200.000 ton arasında olduğu tahmin edilmektedir. Son 50 yıl içerisinde 1 milyon ton antibakteriyel madde biyosfere salınmış ve bunun yaklaşık %50'sinin veteriner ve tarım kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Çiftlik hayvanlarında sağaltıcı olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğu 1950'li yıllardan itibaren koruyucu ve gelişmeyi hızlandırıcı olarak kullanılması sonucu yararlı etkileri yanında insan ve hayvan sağlığını, ülke ekonomisini etkileyecek birçok zararlı etkilerinin de ortaya çıkmasına neden olmuştur. Çiftlik hayvanlarında ilaç kullanıldığı sürece, hayvansal kaynaklı gıdalarda ilaç kalıntıları bulunacaktır. Önemli olan kalıntıların sıklığını ve düzeyini kontrol altında alabilmektir.

Makrolid grubu antibiyotikler insan ve hayvan sağlığında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu grup antibiyotiklerin hücre içi sıvıya kadar girmeleri, doku ve organlara iyi nüfuz etmeleri, yarı ömürlerinin uzun olması gibi önemli üstünlükleri vardır. Zayıf organik bazik ve lipofilik özellikte olmaları nedeniyle sistemik etki amacıyla parenteral uygulamalarda da sütte, plazmaya göre yüksek konsantrasyon (5-8 katı) sağlarlar.

Çalışmanın amacı makrolid grubu antibiyotiklerden tilozin ve tilmikosinin süt ve serumda zenginleştirme yolu ile yüksek basınçlı likit kromatografi-UV (HPLC-UV)'de metot validasyonun yapılması ardından, klinik olarak sağlıklı Holştayn ırkı ineklere tilosin 17,5 mg/kg dozunda Kİ, tilmikosin 10 mg/kg dozunda DA uygulanarak bazı farmakokinetik parametrelerin yardımıyla elde edilecek pozitif serum ve süt örneklerinde seviyelerinin değerlendirilmesidir.

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde bilimsel yardım ve desteklerini esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ olmak üzere değerli Hocalarım Prof. Dr. Ahmet Levent BAŞ, Prof. Dr. Halis OĞUZ, Prof. Dr. Enver YAZAR'a, hesaplamalarındaki yardımlarından dolayı Dr.Kamil ÜNEY'e, Dr. Ayşe ER ve Arş.Gör. Feray ALTAN'a teşekkür ederim.

Konya Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Adnan ÖZTÜRK, Müdür yardımcısı Dr. Hasan GÖZÜN ve Toksikoloji Labarotuvur Şefi Doç. Dr. Ferhan NİZAMLIOĞLU'na, Labarotuvur Uzmanı Dr. İffet DİNÇ'e, Veteriner Hekim Hasan AYDIN'a tezim sırasında göstermiş oldukları destekten dolayı teşekkür ederim.

Tezimin deneysel kısmını çiftliğinde yapmama izin veren Fevzi ÖZTÜRK'e ve deneysel çalışmamda bana yardımcı olan Veteriner Hekim Bahadır HIZARCI, Fatih ELMAZ, Mustafa KAŞIKCI ve Recep KULLUK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince manevi desteklerini esirgemeyen Yüksek Ziraat Mühendisi Tuğba GEZGİN ve Veteriner Hekim Erdem GEZGİN'e teşekkür ederim.

Beni yetiştirip bu günlere getiren aileme ve çalışmalarım sırasında daima desteğini hissettiren değerli Eşim Arş. Gör. Oğuzhan AVCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (08202007) ve Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'ne (TAGEM/GY/09/03/01/163) teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	<b>v-vi</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1-25</b>
1.1. Hayvansal Gıdalarda Kalıntı	1-11
1.1.1. Kalıntının Tanımı ve Çeşitleri	1
1.1.2. Kalıntının Nedenleri	2
1.1.3. Kalıntının Etkileri	2
1.1.4. Sütün Kalıntıdan Arınma Sürecini Etkileyen Faktörler	4
1.1.5. Kalıntı ile İlgili Düzenlemeler	6
1.1.6. Kalıntının Tespitinde Kullanılan Yöntemler	8
1.2. Makrolid Grubu Antibiyotikler	12-25
1.2.1. Makrolid Grubu Antibiyotiklerin Genel Özellikleri	12
1.2.2. Tilozin	14
1.2.3. Tilmikosin	20
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>26-35</b>
2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler	26
2.2. Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar	27
2.3. Hayvan Materyali	27
2.4. Deneysel Uygulamalar	28
2.5. Sütlerde Somatik Hücre Sayımı	28
2.6. Serum Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması	29
2.7. Süt Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması	29
2.8. Tilmikosin ve Tilozinin Miktar Tayinleri	30
2.9. Metot Validasyonu	31
2.9.1. Özgünlük (Specificity) ve Seçicilik (Selectivity)	31
2.9.2. Doğrusallık (Linearity)	31

2.9.3. Doğruluk (Accuracy) ve Geri kazanım (Recovery)	32
2.9.4. Duyarlılık (Sensitivity)	32
2.9.5. Kesinlik (Precision)	33
2.10. Farmakokinetik Hesaplamalar	34
2.11. İstatistiksel Analiz	34
<b>3. BULGULAR</b>	<b>36-43</b>
3.1. Sütlerdeki Somatik Hücre Sayısı	36
3.2. Metot Validasyonu	36
3.2.1. Özgünlük	36
3.2.2. Doğrusallık	38
3.2.3. Geri Kazanım	39
3.2.4. Duyarlılık	40
3.2.5. Kesinlik	40
3.3. Farmakokinetik Parametreler	42
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>44-51</b>
4.1. Metot	44
4.2. Serum	45
4.3. Süt	47
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>52</b>
<b>6. ÖZET</b>	<b>53</b>
<b>7. SUMMARY</b>	<b>54</b>
<b>8. KAYNAKLAR</b>	<b>55-63</b>
<b>9. EKLER</b>	<b>64</b>
Ek-A: Etik Kurul Raporu	64
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>65</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR:

AIC	Akaike Information Criteria
$\alpha$	Serum ilaç yoğunluğu-zaman eğrisinin dağılma dönemi hız sabitesi
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
$\beta$	Serum ilaç yoğunluğu-zaman eğrisinin atılma dönemi hız sabitesi
$C_{\text{doruk}}$	İlacın serumdaki veya sütteki doruk yoğunluğu
Cl	Klirens
CE	Kapillar elektroforez
dk	Dakika
DA	Derialtı
Dİ	Damar içi
EAA	Eğrinin altındaki alan
EKEY	En küçük etkili yoğunluk
EMEA	İlaç Ürünlerini Değerlendiren Avrupa Ajansı
FAO	Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Besin ve İlaç İdaresi
GC	Gaz kromatografisi
HO	Harmonik ortalama
HPLC	Yüksek basınçlı likit kromatografisi
HPTLC	Yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri DSO ve FAO Uzmanlar Komitesi
$K_{01}$	Birinci derece emilme hız sabitesi
$K_{12}$	İlacın merkezi bölme ve çevresel bölme arasındaki birinci derece geçiş hızı sabitesi
$K_{21}$	İlacın çevresel bölme ve merkezi bölme arasındaki birinci derece geçiş hızı sabitesi
kg	Kilogram
KGA	Kabul edilebilir günlük alım
Kİ	Kas içi
LC	Likit kromatografisi
LOD	Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	Ölçülebilirlik sınırı
mg	Miligram
ml	Mililitre
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
MKL	Maksimum kalıntı limiti
MS	Kütle spektrometri
SD	Standart sapma
Sn	Saniye
$t_{\text{doruk}}$	İlacın serumdaki veya sütteki doruk yoğunluğa ulaşma zamanı
$t_{1/2\beta}$	İlacın eliminasyon yarı ömrü

$t_{1/2ab}$

İlacın emilme yarı ömrü

$t_{1/2\alpha}$

İlacın dağılma yarı ömrü



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Hayvansal Gıdalarda Kalıntı

### 1.1.1. Kalıntının Tanımı ve Çeşitleri

Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi, gelişmenin hızlandırılması, yemden yararlanmanın artırılması, paraziter hastalıkların kontrolü ve beslenmenin desteklenmesi amacıyla çok sayıda ilaç, hormon, vitamin ve mineral madde kullanılmaktadır. Özellikle antibiyotiklerin kullanılması ile geçmişte toplu hayvan ölümlerine ve ekonomik kayba yol açmış olan birçok hastalık bugün daha ortaya çıkmadan engellenebilmektedir (Kaya ve Ünsal 2000, Schwarz ve ark 2001, Zeleny ve ark 2006).

Antibiyotikler ve antibakteriyaller çiftlik hayvanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda en çok kullanılan antimikrobiyaller genellikle beş grup altında toplanmaktadır. Bunlar beta-laktamlar, tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler ve sulfonamidlerdir (Mellenberger 1997, O'keeffe ve Kennedy 1998, Güley ve Akbulut 2000, Samanidou ve Nisyriou 2008).

Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı, önlenmesi ve kontrolü ile gelişmenin hızlandırılması amacıyla doğrudan ve dolaylı olarak (yem ya da suya katılan) ilaç ve kimyasal maddelerin kullanılmalarını takiben besin değeri taşıyan doku ve organları ile bunlardan elde edilen besinlerde (et, süt, yumurta gibi) biriken veya depolanan değişmemiş, metabolitleri, parçalanma ürünleri, serbest veya bağlı haldeki madde **kalıntı** olarak tanımlanır. Doku ve organlardaki tolerans düzeylerinin üzerindeki tüm kalıntılar toksikolojik yönden önem taşırlar ve tehlikeli olarak kabul edilirler. Kalıntı; toplam, belirteç, bağlı, ekstre edilebilen, ekstre edilemeyen ve biyoyararlanılabilir kalıntı şeklinde sınıflandırılmaktadır (Kaya ve Ünsal 2000, Doyle 2006).

Avrupa Birliği mevzuatı kapsamında kalıntı, farmakolojik etkiye sahip maddeler, onların metabolitleri ve insan sağlığı için muhtemel zararları olan hayvansal ürünlere geçebilen diğer maddeler olarak tanımlanır (Serratos ve ark 2006).

Kaynatma, pişirme, kavurma, dondurma ve haşlama gibi çeşitli ısı uygulamalarının gıdalardaki kalıntı seviyelerinde çok etkin bir azalmaya neden olmadığı veya tam çözüm olmadığı çeşitli araştırmalarla (Rose ve ark 1995a, Rose ve ark 1995b, Rose ve ark 1995c, Rose ve ark 1996,1997, Mccracken ve Kennedy 1997) ortaya konmuştur. Ayrıca sütte bulunan antibiyotik kalıntılarının miktarında herhangi bir değişiklik olmaksızın doğrudan süt tozuna geçtiği ve kurutma işleminin antibiyotik kalıntılarını etkilemediği de belirtilmiştir (Diserens ve ark 1995, Güley ve Akbulut 2000).

### **1.1.2. Kalıntının Nedenleri**

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1970'li yıllarda Besin ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yapılan bir araştırma sonucuna göre kalıntı olaylarının başlıca nedenleri arasında:

- % 76'sının kesim öncesi bekletme süresine ve süt-yumurtanın tüketilmeme süresine uyulmaması,
- % 12'sinin yem fabrikalarının yemlerdeki karıştırma ve ambalaj hataları,
- % 6'sının farklı yemlerin konulduğu depoların iyi temizlenmemesi,
- % 6'sının da hatalı ilaç kullanımı (aşırı doz, amaç dışı kullanım) sayılmaktadır.

Kalıntının ortaya çıktığı olaylar değerlendirildiğinde; olayların % 10-15'inde Veteriner Hekimlerin, % 85-90'ında ise hayvan yetiştiricilerinin (Veteriner Hekim'in hiç karışmadığı durumlarda > % 80, ilaç hekimden uygulama yetiştiriciden ise % 60-70) sorumlu olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca tedavisi devam eden ineklerin satılması, kuru dönemin kısalığı veya erken buzağılama durumlarının da kalıntıya neden olduğu bildirilmiştir (Jones ve Seymour 1988, Botsoglou ve Fletouris 2000).

### **1.1.3. Kalıntının Etkileri**

Gerek hayvanlar ve gerekse tarım ürünlerinde kullanılan ilaç ve kimyasal maddelerin birçoğu uygulandıkları alan ve canlıların vücudunda kısmen parçalanarak etkisiz veya zararsız hale getirilirken, bazıları (organik klorlu bileşikler, poliklorobifeniller, polibromobifeniller, metaller, bazı mantar ilaçları) da son derece yavaş ayrışmaları nedeniyle giderek artan miktarlarda birikirler. Sonuçta böylece

besin zincirine girerek tüketici durumundaki insanlara kadar ulaşırlar. Gıdalarda bulunan ilaç ve benzeri madde kalıntılarının:

- İnsanlarda hafif bir alerjiden başlayarak, çeşitli doku ve organlarda hasarlara, anafilaktik şoktan ölüme kadar değişen şiddette alerjik olaylara,
- Mutajenik,
- Karsinojenik,
- Teratojenik,
- Farmakolojik etkilere,
- Cinsiyet özellikleri ve davranışlarında değişikliklere (dişilerde erkeksi, erkeklerde dişimsi davranış, belirti ve özelliklerinin ortaya çıkması gibi),
- Üreme bozukluklarına,
- Bakteri, parazit ve protozoa türleri arasında dirençli tür veya suşların ortaya çıkmasına, böylece ilaçların sağaltıcı ve koruyucu etkilerinin azalması ile ilaçların kullanım ömrünün kılmasına,
- Özellikle yoğurt, peynir, tereyağı ve sucuk üretiminde olmak üzere besin endüstrisinde teknolojik açıdan önemli problemlere ve ilişkili olarak ekonomik kayıplara,
- Tüketicilerin sindirim kanalındaki mikroflora topluluğunda değişikliklere yol açabilecekleri kabul edilmektedir (Grove 1959, Uysal ve ark 1995, Gaylor ve ark 1997, Botsoglou ve Fletouris 2000, Kaya ve Ünsal 2000, Schwarz ve ark 2001, Corcia ve Nazzari 2002, Claycamp ve Hooberman 2004, Doyle 2006, Litterio ve ark 2007, Samanidou ve Nisyriou 2008).

1997'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan raporda besinlerdeki kalıntıların muhtemel tehlikeleri gözler önüne serilmiştir. Bu tehlikeler;

- Hayvanlarda bakteriyal dirençliliğin yaygınlaşması ve giderek artması (örneğin çiftik hayvanlarında görülen *salmonella*, *campylobacter*, *enterococcus* türleri ve *E.coli*'ye karşı direnç oluşması),
- İnsanlara dirençli patojenlerin transferi (hayvanla direkt temas, kontamine su veya gıdaların tüketilmesi)
- Dirençli patojenlerden dolayı insanlarda enfeksiyonların sıklığının artması
- İnsan ve hayvanda muhtemel terapötik başarısızlıklardır (Schwarz ve ark 2001, Altekruze ve ark 2002, Beach ve ark 2002, Hayes ve ark 2004, Aarestrup 2005,

Belloc ve ark 2005, Bywater ve ark 2005, Chapin ve ark 2005, Englen ve ark 2005, Farnell ve ark 2005).

Antibiyotik kalıntısı içeren süt ve süt ürünlerinin uzun süreli tüketimi sonucu vücudun bağışıklık sisteminin zayıflamasına, özellikle çocukların beslenmesinde önemli yer tutan sütlerde bu kalıntıların varlığı ise çok çeşitli sağlık sorunlarına neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca fermente süt ürünlerinde kullanılan starter kültürlerin, antibiyotik kalıntılarının çok düşük konsantrasyonlarına da çok duyarlı oldukları bildirilmektedir (Marya-Makinen 1995, Güley ve Akbulut 2000). Sütteki antibiyotik kalıntıları peynir, tereyağ ve yoğurttaki starterlerin aktivitesini geciktirmenin yanında, tereyağ üretiminde asit ve aroma maddelerinin üretimini azaltmakta, sütün pıhtılaşmasını etkilemekte ve peynirin olgunlaşmasında problemlere neden olmaktadır (Jones 1999, Yaygın 1999).

#### **1.1.4. Sütün Kalıntıdan Arınma Sürecini Etkileyen Faktörler**

Antibiyotiklerin sütteki kalıntı miktarını; antibiyotik çeşidi, antibiyotik dozu, antibiyotiğin uygulanma şekli, memenin hastalık durumu, tedavi süresi, birden fazla ilacın kullanımı, sağım sayısı, mevsim, tedavi sürecinde sütün tüketilmeme süresine uyulmaması gibi faktörler etkileyebilmektedir (Uysal ve ark 1995, Jones 1999, Kaya ve Ünsal 2000).

Meme içi enjeksiyon sırasında meydana gelen kompozisyondaki değişiklikler süttten antibiyotiğin ekstraksiyonunu etkileyebildiği ve sütün tüketilmeme zamanını değiştirebildiği bildirilmiştir (Litterio ve ark 2007).

Herhangi bir maddenin iyonlaşma derecesi ortamın pH'sı ve ilacın pKa değerine bağlıdır. pKa değeri herhangi bir asidik veya bazik madde için sabit bir sayıdır ve asidik iyonlaşma sabitesinin ( $K_a = k_1/k_2$  veya  $[H^+].[A^-]/[HA]$  bu bir bileşiğin hidrojen iyonlarını kabul etme yeteneğinin ölçüsüdür) negatif logaritması olarak (yani  $pK_a = -\log K_a$ ) tanımlanır. pKa bir asit veya bazın nisbi gücünü gösterir; örneğin pKa'sı 5 ( $K_a = 1 \cdot 10^{-5}$ ) olan asit madde pKa'sı 3 ( $K_a = 1 \cdot 10^{-3}$ ) olandan daha zayıftır; yani daha az iyonize haldedir (Miller ve ark 1967, Kayaalp 1991, Kaya 2000b).

İlaçların çoğu zayıf organik asit veya bazik niteliktedir ve çözelti halinde hem iyonize hem de noniyonize halde bulunurlar. Kural olarak ortam pH'sı düştüğü ölçüde zayıf organik asitlerin noniyonize kısmı artar ve emilmeleri kolaylaşırken, zayıf organik bazların iyonize moleküllerinin oranı yükselir ve emilmeleri azalır, bu durum *pH Dağılım Hipotezi* olarak bilinmektedir (Kayaalp 1991, Kaya 2000b).

İlaçların çoğunun pKa değeri 3 ile 11 arasındadır ve vücudun normal pH sınırları içinde hem iyonize hem de noniyonize şekilde bulunmaktadır. Biyolojik zarların her iki yüzündeki pH farkı sebebiyle ilaçların bu kesimlerdeki iyonlaşma dereceleri de farklı olmaktadır. Denge halinde iyonlaşma oranının yüksek olduğu taraftaki toplam ilaç miktarı da (iyonlaşmış+iyonlaşmamış molekül) fazladır; bu olay *İyon Tuzağı Mekanizması* olarak bilinmektedir (Miller ve ark 1967, Kayaalp 1991, Kaya 2000b).

Kan ve süt arasında antibiyotiklerin dağılımı asidik, bazik özelliklerine ve pKa değerlerine bağlı olarak değişmektedir. Temel olarak noniyonize olan yağda çözünen antibiyotikler kandan süte çok kısa bir sürede pasif difüzyonla geçmektedirler (Miller ve ark 1967, Kınık ve ark 2002).

Besin değeri olan hayvanlarda kullanılan ilacın dozu ve yarı ömrü, dokulardaki kalıntı miktarını ve kesim öncesi bekletme süresi ile süt, yumurta tüketmeme süresini doğrudan etkiler. İlacın dozunun iki katına çıkarılması kendisi için belirlenmiş kesim öncesi bekletme veya süt ya da yumurtanın tüketilmeme süresini bir yarı ömür boyu uzatırken yarı ömrün iki katına çıkması bunlara iki katı yansımaktadır. Bu sebeple yarı ömür-kalıntı, yarı ömür-kesim öncesi bekletme süresi ilişkisi önemlidir. Yarı ömre bakılarak bir maddenin vücutta bulunan veya kalan oranı ya da miktarı hakkında fikir edinilebilir. Örneğin başlangıçta ette 5 ppm düzeyinde bulunan herhangi bir madde kalıntısı yarı ömrünün 2 katı bir süre sonunda %75'i atılarak 1.25 ppm'e, 4 katı bir süre sonunda %93.73'i atılarak 0.312 ppm'e, 6 katı bir süre sonunda 0.078 ppm'e ve 10 katı süre sonunda da 0.004875 ppm'nin altına inmiş olacaktır. Yani 10 yarı ömürlük sürede ilacın vücuttan %99.9'u atılmaktadır. Yarı ömrün yaklaşık 6-7 katı bir süre sonunda vücuttaki ilaç yoğunluğu sağaltıcı etki oluşturacak seviyenin altına indiği ve bu noktadan sonra vücutta

bulunan ilaç veya metabolitin esasta kalıntıyı gösterdiği kabul edilir. İlacın yarı ömrünü dağılım hacmi (Vd) ve klirens (Cl) gibi parametreler etkiler; Cl'in 3 katı yavaşlaması veya Vd'nin 2 katı genişlemesi ilacın atılma yarı ömrünün 6 katı daha uzamasıyla sonuçlanır; bu durum normal hayvanlara göre bekletme süresinin hastalarda 6 katı daha uzun olması gerektiğini gösterir (Kaya ve Ünsal 2000).

### **1.1.5. Kalıntı ile İlgili Düzenlemeler**

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

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

İlaçların kalıntı ve katkıları konusunda uluslararası düzeyde çalışma yapan başlıca organizasyonlar; ana hatları CCRVD (Codex Committee on Residue of Veterinary Drugs in Food) tarafından JECFA (Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives)'nın bilimsel tavsiyeleri esas alınarak belirlenmiş Kodeks Alimentarius Komisyonu ve EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)'dır (Mitchel ve ark 1998, Güley ve Akbulut 2000). FAO/WHO'nun ortak bir girişimi olan Kodeks Alimentarius, 1985'ten beri gıdalarda bulunabilen kalıntılar için çeşitli standartlar hazırlamaktadır. Bu standartlarda antibiyotiklerin gıda maddelerinde maksimum kalıntı düzeyleri şeklinde önerilen miktarları belirtilmekte ve FAO/WHO ortak komitesince gerçekleştirilen bilimsel çalışmalara dayandırılmaktadır (Kınık ve ark 2002). WHO, Avrupa Birliği direktifleri ve Türk Gıda Kodeksi'ne (2005) göre antibiyotik tedavisi gören ineklerin

sütlerinin satışı sunulması, süt ürünlerinin üretiminde kullanılması ve buzağıya verilmesi yasaklanmıştır.

Gıdalardaki ilaç kalıntılara karşı tüketici sağlığının etkin bir biçimde korunabilmesi için her çeşit hayvansal besinde bulunabilecek ilaç kalıntısı çeşitleri ve kirlenme düzeylerinin sınırlandırılması son derece önem taşır. Bu nedenle, bilimsel ve yasal denetime temel oluşturacak şekilde, hayvanlarda çeşitli amaçlarla (sağaltıcı, koruyucu, gelişmeyi hızlandırıcı gibi) kullanılmasına izin verilen her veteriner hekimliği ilacı için; hayvanlara uygulanabilecek en yüksek dozları, sağaltım süreleri, su veya yemlere katılan en yüksek miktarları, ilaç verilen hayvanların son ilaç uygulamasını takiben kesilmeme veya süt, yumurta gibi besinlerin tüketilmeme süreleri, hayvansal besinlerde bulunmasına izin verilen kalıntı miktarları, kabul edilebilir günlük alım miktarları ve çoğu deney sistemlerindeki etkisiz miktarlarının belirlenmesi ve bilinmesi gerekmektedir (Kaya ve Ünsal 2000).

Avrupa Komisyonunun teklifiyle 1996 yılında Avrupa Konseyi iki direktif yayınladı. 96/22/EC ve 96/23/EC direktifleriyle önceki direktifler yürürlükten kaldırıldı ve hayvansal orijinli gıdalarda kalıntıların kontrolü için yasal sistem oluşturulması kararlaştırılmıştır. 96/22/EC direktifiyle çiftlik hayvanlarında beta-agonistlerin ve hormonal veya tirostatik etkisi olan bazı maddeler yasaklanmıştır. 96/23/EC direktifiyle Avrupa Birliği üyesi ülkelerde canlı hayvanlar ve hayvansal ürünlerin her ikisinde de izlemeye alınan madde ve kalıntıların ölçüleri belirlenmiştir (Serratos ve ark 2006).

Avrupa Birliği Komisyonu tarafından yayınlanan 96/23/EC sayılı direktifte sütlerde aranacak maddeler belirlenmiştir (Çizelge 1.1). Bu maddelerin aranması Türkiye’de de 19.01.2005 tarih ve 25705 sayılı Resmi gazetede yayımlanan “Canlı hayvanlar ve hayvansal ürünlerde belirli maddeler ile bunların kalıntılarının izlenmesi için alınacak önlemlere dair yönetmelik” çerçevesinde aynen benimsenmiştir.

Özellikle son yıllarda sütte antibiyotik mevcudiyeti, kalıntı testlerinin düzenli şekilde gerçekleştirildiği ülkelerde dikkati çekecek ölçülerde azalmış ve inhibitör

pozitif çiftlik sütleri sayısının genel olarak % 0,1- 0,5 düzeylerine indiği bildirilmiştir (Güley ve Akbulut 2000).

**Çizelge 1.1. Çiğ sütte aranması gereken kalıntı ve kontaminantlar (Resmi Gazete 2005).**

Grubu	Maddeler
A <sub>6</sub>	2377/90 ECC ek IV ve T.C Resmi gazetede yayınlanan 2002/30 No'lu Tebliğ'de sütte hiçbir seviyede bulunmaması gereken farmakolojik etkili maddeler (Aristolochia türleri ve bundan hazırlananlar, kloramfenikol, kloroform, kolşinin, dapson, dimetridazol, nitrofuran, furazolidon, ronidazol)
B <sub>1</sub>	Sulfanamid ve kinolon grubu da dahil antibiyotikler
B <sub>2a</sub>	Antelmantikler
B <sub>2e</sub>	Steroid olmayan ateş düşürücü ilaçlar
B <sub>3a</sub>	Organik klorlu bileşikler
B <sub>3b</sub>	Organik fosforlu bileşikler
B <sub>3c</sub>	Kimyasal elementler
B <sub>3d</sub>	Mikotoksinler

Kalıntının istenmeyen etkilerinden kaçınmak amacı ile besinlerdeki kimyasal madde ve ilaç kalıntılarını ve düzeylerini tespit edebilmek için son derece hassas (ppb ve ppt düzeyinde ölçüm yapabilen) güvenilir ve tekrarlanabilir analiz metotları geliştirilmiştir. WHO, FAO, Avrupa Birliği, ABD'deki FDA, ülkemizde Tarım ve Sağlık Bakanlığı gibi önemli kurumlar, tüketici sağlığının korunması da dahil ilaç kalıntılarının yol açabileceği ekonomik ve sosyal olumsuzlukların önlenmesi ve veteriner hekimliği ilaçlarının kullanımı alanında etkin bir kontrolün sağlanmasına yönelik çalışmalar yürütmeye devam etmektedirler (Kaya ve Ünsal 2000).

**1.1.6. Kalıntının Tespitinde Kullanılan Yöntemler**

Güvenli gıdanın temininde Avrupa Birliği, FDA gibi bazı düzenleyici otoriteler MKL (maksimum kalıntı limiti) ve KGA (kabuledilebilir günlük alım) miktarı düzeylerini belirlemektedirler. Veteriner ilaç kalıntılarının izlenmesi de Avrupa Birliği 96/23/EC nolu konsey direktifi ile düzenlenmiştir. Belirtilen seviyenin altında tespitler yapabilecek analitik metotların gerçekliği, sensitivitesi ve



spesifitesi gibi gereklilikleri izleme programında belirtilmektedir (Samanidou ve Nisyriou 2008).

Birçok ülkede gıdalarda antibiyotiklerin aranması için farklı metotlar geliştirilmiştir. Bu metotlar mikrobiyolojik testler [Delvotest-P, Brilliant Black Reduction (BR) test, CHARM farm test, Swab Test on Premises (STOP), Live Animal Swab Test (LAST), Calf Antibiotic and Sulfa Test (CAST) vs.], radyokimyasal, radioimmunoassay, enzim immunoassay, fluoroimmunoassay ve diğer immunoassay testleri, X-ray kristalografi, nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopisi, ince tabaka kromatografi (TLC) gibi **tarama metotları** ile gaz kromatografi (GC), yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC), likit kromatografi-kütle spektroskopisi (LC-MS), gaz kromatografi-kütle spektroskopisi (GC-MS) gibi **teyit metotlarından** oluşmaktadır (Harik-Khan ve Moats 1995, Anderson ve ark 1996, Botsoglou ve Fletouris 2000, Stead 2000, Ramirez ve ark 2003, Zeleny ve ark 2006).

Sütteki antibiyotik kalıntısının belirlenmesinde 4 büyük problem bulunmaktadır:

1. Ana madde ve metabolitler büyük bileşiklerdir. Uygulanan antibakteriyaller metabolik süreç içerisinde oksitlenme, indirgenme veya hidrolize uğrarlar ve oluşan bazı metabolitler ana maddeden daha toksiktir ve bunlar hayvansal gıdalarda uzun süre stabil kalabilir.
2. Farklı antibiyotikler farklı kimyasal özelliklere sahiptir.
3. Çok düşük konsantrasyonlarda görülürler (genellikle ppb seviyesinde)
4. Süt kompleks bir matristir. Proteince zengin (~%3) olduğundan bazı antibakteriyaller bunlara kolaylıkla bağlanabilmektedir. 2 veya 3 değerli bileşikler bazı antibakteriyaller ile kompleks form oluştururlar, farklı dokularda birikerek artış gösterebilirler (Samanidou ve Nisyriou 2008).

Mikrobiyal inhibitör test beta-laktamlar özellikle penisilin için son derece hassasken, makrolidler, tetrasiklinler veya kloromfenikoller gibi antibiyotikler için 100 kat daha az duyarlıdır. Testin performansı agar kompozisyonu ve pH, test kültürünün tipi, inkubasyon ısısından etkilenmektedir. Yüksek orandaki süt protein ve yağları antibiyotik kalıntı test performansını olumsuz yönde etkilemektedir ancak

etkinin derecesi tarama testinin analitik metoduna da bağlıdır. Mikrobiyal inhibisyon testi için örneklerin depo ve ısı özelliklerinin kontrolü test performansını etkileyen önemli faktörlerdir. Sütün hızla soğutulması lipolizi ve yanlış pozitiflik riskini de azaltır (Andrew 2000, Botsoglou ve Fletouris 2000, Riediker ve ark 2004, Kirbis 2006).

Tilozin için HPLC prosedürünün spesifikite ve sensitivitesinin mikrobiyolojik testlerden daha iyi olduğu çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Moast 1985, Moast ve ark 1985, Helton-Groce ve ark 1993, Dudrikova ve Lehotsky 1998).

Tarama testleri ile sütte antibiyotik tipleri tanımlanamamakta ve resmi olarak güvenlik sınırlarının altındaki antibiyotik miktarlarında da pozitif sonuç vermesi nedeni ile sütlerin gereksiz yere imha edilmesi söz konusu olmaktadır (Shaikh ve Moats 1993, Schenck ve Callery 1998, Boatto ve ark 1999, Cinguina ve ark 2003). Somatik hücreler, laktoferrin, yağ ve proteinin sütteki derişimleri arttığında genellikle testlerde yanlış pozitif sonuçların oranının arttığı görülmüştür. Ayrıca doğumdan sonraki zamanda yağ ve protein derişimleri artmakta ve bunun yanında kolostrumdaki immunoglobulin ve laktoferrin derişimleri yüksek oranda bulunmaktadır. Bakteriyel inhibisyon testinin kolostrum üzerine uygulandığında yüksek düzeyde yanlış pozitif sonuçlarla karşılaşıldığı bildirilmiştir (Andrew 2000). Bu nedenlerle sütte antibiyotik kalıntılarının tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için özel ve analitik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır (Schenck ve Callery 1998).

Hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntısının tesbitinde kullanılan ELISA, biyosensörlü biyoçipler, HPTLC ve HPLC'nin avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.2'de özetlenmiştir.

Mikrobiyal ve klasik kromatografik metotlar günümüzde yerini LC-MS, LC MS/MS, LC-ESI (electrospray ionisation) tandem mass spectrometry, LC-MS-APCI (atmospheric pressure chemical ionisation) gibi eş zamanlı tarama ve doğrulama yapabilen cihazlara bırakmaktadır. Ancak bunlar çok pahalı ve ileri derecede uzmanlık gerektiren cihazlardır (Dubois ve ark 2001, Hwang ve ark 2002, Civitareale ve ark 2004, Wang ve ark 2006).

**Çizelge 1.2. Kalıntı izlemede kullanılan bazı kalitatif ve kantitatif yöntemlerin avantaj ve dezavantajları (Schenck ve Callery 1998, Botsoglou ve Fletouris 2000, Toldra ve Reig 2006).**

<b>Kullanılan Yöntemler</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
<b>ELISA kitleri</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kullanımı kolay</li> <li>• Çok sayıda spesifik bileşik için kitler mevcuttur (örn: klenbuterol, zeranol vs.)</li> <li>• Bileşik aileleri için de kitler mevcuttur (örn: agonistler, stilbeneler, sülfonamidler vs.)</li> <li>• Bir seferde çok sayıda (42) örneğe bakılabilir</li> <li>• Sonuç için birkaç saat (2-2,5 saat) yeterlidir</li> <li>• Hassasiyeti yüksektir</li> <li>• Spesifitesi yüksektir</li> <li>• Gıda işleme tesisleri içinde kullanımı kolaydır</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2002 yılından bu zamana kadar kit fiyatları artmakta (bir kit €650 dan fazla)</li> <li>• Buzdolabı şartlarında saklanması sınırlı (5 ay kadar)</li> <li>• RIA kullanımı pahalı ve atıklarının imhasını gerektirmektedir</li> <li>• Bileşenlerden dolayı bazen yanlış pozitiflikler verir</li> <li>• Bir kit sadece bir grup ilaç için kalıntıyı araştırır</li> </ul>
<b>Biyosensörlü biyoçipler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kullanımı kolay</li> <li>• Kısa sürede sonuç elde edilir</li> <li>• Bir seferde çoklu kalıntı analiz edilir (sırayla birkaç çip)</li> <li>• Tamamen otomatik, verimliliği yüksek</li> <li>• Teknik verimliliği yüksek, bir saatte 120 örnek işlenebilir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Başlangıçta ekipmanlar için yüksek miktarda yatırım gerektirmektedir</li> <li>• Çiplerin çalıştırılması çok pahalı</li> <li>• Analizler için mevcut çipler sınırlı</li> </ul>
<b>HPTLC (High Performance Thin-Layer Chromatography)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bir seferde çok örnek analiz edilir</li> <li>• Kısa sürede (birkaç saat) sonuç elde edilir</li> <li>• Otomasyon ile verimlilik yükseltilebilir</li> <li>• Hassas</li> <li>• Spesifikliği dedektörün tekniğine bağlı</li> <li>• Ayrılan örneklerin gelecekte doğrulama analizi yapılabilir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uzmanlık gerektirmekte</li> <li>• Örneklerin hazırlanması gerekir (ekstraksiyon, filtrasyon gibi)</li> <li>• Karışıklardan dolayı bazen yanlış pozitiflikler verir</li> <li>• Tek ince tabaka plakasında sadece bir kalıntı araştırılır</li> </ul>
<b>HPLC (High Performance Liquid Chromatography)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kısa sürede (birkaç dakika/örnek) sonuç elde edilir</li> <li>• Hassas</li> <li>• Spesifikliği dedektöre bağlı</li> <li>• Otomasyon verimliliğinin artmasına neden olur</li> <li>• Diode array detector (DAD) kullanıldığında spektrum alınarak daha fazla bilgiye ulaşmak mümkün</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uzmanlık gerektirmekte</li> <li>• Örneklerin hazırlanması gerekir (ekstraksiyon, filtrasyon gibi)</li> <li>• Başlangıçta ekipmanlar için yüksek miktarda yatırım gerektirmekte</li> <li>• Kolonlar pahalı</li> </ul>

## 1.2. Makrolid Grubu Antibiyotikler

### 1.2.1. Makrolid Grubu Antibiyotiklerin Genel Özellikleri

Makrolid antibiyotikler 14-, 16- ve 17- üyeli makrosiklik lakton halkasına sahip, bir veya daha fazla deoksi veya genellikle amino şekerler ile glikozidlerin bağlandığı temel makrosiklik bileşiklerdir. Makrolid antibiyotiklerinin çoğu *Streptomyces strain*'in sıvı kültür ortamından izole edilen birleşiklerdir. Mirosamisin ise mikromonospora tarafından üretilir (Botsoglou ve Fletouris 2000, Amsden 2001, Draisci ve ark 2001, Retsema 2001).

Makrolidler bakteriyel ribozomların 50 S alt ünitelerine etki ederek peptidil transferazın inhibisyonu ile protein sentezini bozarlar. Peptidiltransferaz enzimini bloke ederek peptidilin t-RNA'ya bağlanarak gelecek amino asite bağlanmasını ve ribosomal translokasyonu inhibe ederek protein sentezini baskılar. Diğer potansiyel mekanizma ribozomdan peptidil t-RNA'nın tamamlanmadan ayrılmasıdır. Sonuçta bakteriyel üreme engellenir. Genel olarak makrolidler bakteriyostatik antibiyotiklerdir, yüksek konsantrasyonlarda bakterisid etki gösterebilirler. Makrolidler belirgin postantibiyotik etkiye sahiptir. Bu özellik yeni makrolidlerde daha fazladır (Botsoglou ve Fletouris 2000, Lim ve Yun 2001, Samanidou ve Nisyriou 2008).

Makrolidler, gram pozitif bakterilerin geniş bir bölümüne karşı kuvvetli etkiye sahipken, gram negatif bakterilerin çoğuna karşı etkisi sınırlı veya yoktur. Özellikle mikoplazmaların neden olduğu hastalıklara karşı çok etkilidir. (Kanfer ve ark 1998, Botsoglou ve Fletouris 2000, Retsema 2001).

Makrolidler sığır, koyun, domuz ve kanatlılarda genellikle solunum yolları hastalıklarının ve enterik enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Bununla birlikte gelişmeyi hızlandırıcı ve hastalıkları önleyici olarak hayvan yemlerine ilave edilerek de kullanılmıştır (Draisci ve ark 2001).

Makrolidlerin hücrelere iyi girmeleri, doku ve organlara iyi nüfuz etmeleri ve yarı ömürlerinin uzun olması gibi önemli farmakokinetik üstünlükleri vardır.

Aynı zamanda zayıf organik bazik ilaçlardır; pKa'ları 6-9 arasında değişir (Kanfer ve ark 1998, Kaya 2000a).

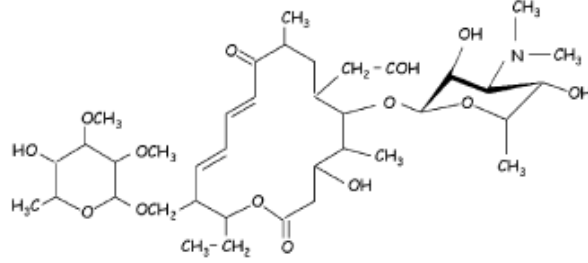
İyon tuzağı ve pH dağılım hipotezine göre ilaçların bir kısmı meme bezine kolay geçmekte ve süt ile atılmaktadır. Meme bezi epiteli kanla süt arasında bulunan biyolojik bir zardır. Sütün pH'sı (6,5- 6,8) plazma pH'sına göre (7,49) biraz düşüktür. Bu durum kanda iyonize olmamış ve yağda kolay çözünen zayıf organik bazik ilaçların süte yüksek yoğunlukta geçmesi ile sonuçlanmaktadır (Ziv ve ark 1973, Ziv ve Sulman 1974, Kaya 2000b).

Makrolid grubu antibiyotikler genellikle düşük toksik tesire sahiptir (Botsoglou ve Fletouris 2000, Retsema 2001). Makrolid grubu antibiyotiklerin nadir yan etkilerinden dolayı klinik kullanımda güvenli antibiyotik ilaçlar arasında yer almaktadır (Periti ve ark 1993). Makrolidlerin kardiyovasküler sistem üzerine bazı yan etkileri bildirilmesine rağmen (Wakabayashi ve Yamada 1972, Tamargo ve ark 1982, Freedman ve ark 1987), bunlar tedavi edici olandan daha yüksek dozlarda kullanım sonrası kardiyak durumda ve böbrek fonksiyonlarında bozukluklara neden olmaktadır. Tilmikosinin kardiyovasküler toksik etkisinin etiket dışı farklı uygulama yollarının ve yüksek dozların tercih edilmesi ile geliştiği bildirilmiştir (Jordan ve ark 1993).

Makrolid grubu antibiyotiklerin yenilebilir dokularda ve sütteki kalıntıları tüketicilerde kişisel duyarlılığa bağlı alerjik reaksiyonlar gibi toksik etkiler, indirekt olarak bakteri türlerinde direnç oluşması ve gıda endüstrisinde üretim hataları gibi problemlere neden olur (Draisci ve ark 2001, Gomis ve ark 2004, Samanidou ve Nisyriou 2008). Dewdney ve ark (1991), gıda ürünlerindeki makrolid grubu antibiyotik kalıntılarının immunoallerjik potansiyelinin çok düşük olduğunu bildirmişlerdir.

## 1.2.2. Tilozin

### Yapısal Özellikleri



**Şekil 1.1.** Tilozinin kimyasal yapısı (Kanfer ve ark 1998, Garcia-Mayor ve ark 2006).

Tilozin (tilozin A), 1960'da Mac Fuire tarafından *Streptomyces fradie* kültürlerinden elde edilmiştir (Şekil 1.1). Desmikosin (tilozin B), makrosin (tilozin C), relomisin (tilozin D) gibi minor bileşikleri; laktenosin (tilozin L), 5-O- mikaminosiltionolid (OMT) ve desmisinosil tilozin (DMT) gibi metabolitleri vardır (Kirst ve ark 1988, 1989, Debono ve ark 1989, Roets ve ark 1993, Kanfer ve ark 1998, Botsoglou ve Fletouris 2000, Kaya ve Bilgili 2000). Moleküler formülü  $C_{46}H_{77}NO_{12}$ , moleküler ağırlığı 916,10, **pKa değeri 7,1**'dir (Gingerich ve ark 1977, Lewicki 2006, Usp 2007).

Tilozin, kuru toz halinde beyaz-kirli beyaz renkte, suda çok az (5 mg/ml), **alkol dahil diğer organik çözücüler ve yağda iyi çözünebilen** bir maddedir. İlaç zayıf bazik tepkimelidir (pKa 7,1) ve asitlerle tuz oluşturur. Daha çok baz, tilozin tartarat ve fosfat halinde kullanılmaktadır. Enjektabl formülasyonu, 200 mg/ml tilozin baz içeren visköz, sarı renkli bir sıvıdır. Işıktan etkilendiği için tilozin ile yapılması düşünülen araştırmalarda ışıktan korunarak çalışılmalıdır (Kaya 2000a, Lewicki 2006).

### Etki Spektrumu ve Kullanımı

Tilozin, *Mikoplasma* ve Gram-pozitif bakterilere karşı bakteriyostatik etki gösterir. Bunlar: *Leptospira*, *Spiroket*, *Erisipelas* türleri, *Haemophilus pertussi*, *Moraxella bovis*, *Borrelia anserina*, *Treponema hyodysenteria*, beta laktam ve penisilinlere dirençli *staphylococcus* ve *streptococcus* türleridir. Ayrıca *Eimeria*

*tenella*'nın oosistlerine de etkilidir (De Liguoro 1998, Kaya 2000a, McDougall ve ark 2006).

İlacın duyarlı bakterilerdeki en küçük etkili yoğunluğu (EKEY) 0,1- 0,5 µg/ml arasında değişmekte ve EKEY ≤ 0,7 µg/ml olan bakteriler ilaca duyarlı olarak kabul edilmektedir. Bazı bakteriler için EKEY değerleri: Pasteurella türlerinde 6,25 µg/ml, beta-hemolitik streptokoklar'da ≥ 0,4 µg/ml, mycoplasma ve clostridium türlerinde 0,5 µg/ml, streptokoklarda 0,2- 0,7 µg/ml, beta-laktamaz salgılayanlarda dahil *Staph. aureus*'da 0,7 µg/ml ve Bacteroides türleri için ise 1 µg/ml'dir (Kaya 2000a).

Tilozin, sığır ve danalarda uterus, akciğer hastalıkları ve çatal çürüğü; koyun ve keçilerde akciğer, göğüs zarı hastalıkları ve yavru atma; köpek ve kedilerde solunum yolu hastalıkları, uterus yangısı, leptospiroz ve viral hastalıklarla seyreden ikincil bakteriyal hastalıklarda kullanılabilir (Kaya 2000a, Marsteller ve ark 2001). Besi sığırlarının ve laktasyonda olmayan sütçü sığırlarda *Fusobacterium necrophorum* ve *Actinomyces pyogenes* şüpheli hepatik apselerin, *Fusobacterium necrophorum* şüpheli difterilerin, metritis, mastitis ve pododermatitisin tedavisinde tilozin kullanılır (Usp 2007).

Tilozin baz halinde köpek ve kedilere günde 1-2 kez 2,2- 4,4 mg/kg (10 mg/kg' a kadar artırılabilir); koyun ve keçilere günde 1 kez 6,6 mg/kg ve sığırlara günde 1 kez 4-10 mg/kg; kanatlılara günde 2-3 kez 10-40 mg/kg dozlarda uygulanır. (De Liguoro 1998, Kaya 2000a, Botsoglou ve Fletouris 2000).

Tilozin, hayvanlarda (at hariç) klinik kullanımı açısından son derece güvenli bir maddedir. Sıçan ve farelerde ÖD<sub>50</sub>'si ağızdan 5 g/kg'dan büyük ve Dİ yolla 500 mg/kg dolayındadır. İlaç gevişenlerde ve atlarda şiddetli sürgüne yol açabilir. Sığırlara ağızdan verildiğinde rumen hareketlerinde kaybolma, iştahsızlık, dışkının pis kokması, süt veriminde azalma gibi istenmeyen etkilerle karşılaşılır. Bu nedenle gevişenlere ağızdan verilmemelidir. Ayrıca Dİ yüksek dozda verildiğinde şok ve solunum güçlüğüne neden olabilir (Modric ve ark 1998, Kaya 2000a).

## Farmakokinetiği

Oral ve parenteral uygulamadan sonra iyi emilir ancak atılımı yavaştır. Tilozin % 25-47 oranında serum ve %15 oranında süt proteinlerine bağlanır (Ziv ve Sulman 1973, Gingerich ve ark 1977). İnek ve domuzlarda tartarat tuzu ve % 50 propilen glikoldeki baz tilozin KI enjeksiyonu takiben 2-4 saatte kanda pik konsantrasyona ulaşır (Gingerich ve ark 1977). Hayvanların çoğunda yarı ömrü ( $t_{1/2}$ ) 3-4 saat ve dağılım hacmi ( $V_d$ ) 1-7 L/kg arasında değişir. Bazı hayvan türlerindeki farmakokinetik değişkenleri Çizelge 1.3'de verilmiştir. Dolaşıma geçen ilaç Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) hariç tüm vücut kesimlerine etkili olabilecek yoğunluklarda geçer. İlaç süte kolay geçer ve sütteki yoğunluğu plazmadakinin 5 katına çıkabilir. Tilozin vücutta pek değişikliğe uğramaz, vücudu başlıca safra, süt ve kısmen de idrarla terk eder (Botsoglou ve Fletouris 2000, Kaya 2000a).

İlacın süt ve plazmadaki dağılımını etkileyen en belirgin faktör pH'ları ile ilaç pKa'sıdır (Baggot 1980). Tilozin (pKa= 7,1) plazmada (pKa= 7,4) yüksek oranda noniyonize ve yağda çözünür formda bulunur. Bu nedenle normal süte (pH= 6,8) geçtiğinde iyonize forma dönüştüğünden iyon tuzağı gereğince dolaşıma geri dönmez. Klinik mastitis durumlarında ise genellikle sütin pH'sı 7,5'e ulaşır ve tilozin süte yüksek oranda noniyonize formda bulunur. Bu durum ise ilacın plazma ve süt arasındaki karşılıklı geçişine izin verdiğinden ilacın normale göre mastitli durumlarda daha uzun süre sütle atılmasına neden olur. Bu olay proteine bağlanma oranı ve pH partiyon kavramı ile açıklanmaktadır. Bu sonuç tilozinin süte noniyonik difüzyon ile geçişini göstermektedir (Ziv ve Sulman 1973, Baggot 1980).

Rat, domuz, tavuk ve sığırlarda yapılan çalışmalarda tilozin metabolizmasının benzer olduğu bildirilmiştir. Tilozin öncelikle karaciğerde metabolize olur. Sonuçta tilozin dört büyük (Tilozin A, B, C ve D) ve birkaç küçük metabolite (laktenosin, 5-O-mikaminosiltionolid ve desmisinosil tilozin) dönüşür. Sığır, rat, tavuk ve domuzlarda dokulardaki ana kalıntı Tilozin A'dir (WHO 2008).



**Çizelge 1.3. Tilozinin farklı hayvan türlerinde bazı farmakokinetik parametreleri (Lewicki 2006).**

Hayvan türü	Uygulama yolu ve dozu (mg/kg)	Proteine bağlanma oranı (%)	Doruk konsantrasyon C <sub>doruk</sub> (µg/ml)	Doruk konsantrasyona ulaşma zamanı T <sub>doruk</sub> (h)	Biyoyararlanım F (%)	Eliminasyon yarı ömrü t <sub>1/2el</sub> (h)	Toplam klerens Cl <sub>B</sub> (ml/min/kg)	Dağılım hacmi V <sub>a</sub> (l/kg)	Kaynaklar
İnek	Dİ, 12,5 <sup>a</sup>	-	-	-	-	1,62	7,8	1.1 Doku/Plazma Oranı - 2.05	Baggot ve Gingerich 1976
İnek	Dİ, 20 <sup>b</sup> Kİ, 20 <sup>b</sup>	33,5-44 -	- ~ 2,5	- 5	- -	2,14 -	- -	1,56 -	Ziv ve Sulman 1972, 1973
İnek	Dİ, 12,5 <sup>a</sup> Kİ, 12,5 <sup>a</sup>	- -	- < 1	- 1,5-4	- -	1,62 -	- -	1,1 -	Gingerich ve ark 1977
İnek	Kİ, 10 <sup>a</sup>	-	5,83 <sup>d</sup>	0,75 <sup>d</sup>	-	3,02 <sup>d</sup>	5,46 <sup>d</sup>	-	El-Sayed ve ark 1986
İnek	Dİ, 10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	2,77 <sup>e</sup> 2,84 <sup>f</sup>	7,43 <sup>e</sup> 8,78 <sup>f</sup>	1,84 <sup>e</sup> 2,27 <sup>f</sup>	Cester ve ark 1993
Buzağı	Dİ, 10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	2,32 <sup>g</sup> 0,95 <sup>h</sup> 1,53 <sup>i</sup>	24,5 <sup>g</sup> 42,2 <sup>h</sup> 37,0 <sup>i</sup>	4,4 <sup>g</sup> 3,52 <sup>h</sup> 5,68 <sup>i</sup>	Burrows ve ark 1983
Buzağı	Dİ, 10 <sup>a</sup>	-	-	-	-	1,22 <sup>i</sup> 0,84 <sup>ij</sup>	23,7 <sup>i</sup> 26,4 <sup>ij</sup>	2,48 <sup>i</sup> 1,91 <sup>ij</sup>	Burrows ve ark 1986
Buzağı	Kİ, 25 <sup>a</sup> DA, 25 <sup>a</sup> Tİ, 25 <sup>a</sup>	- - -	2,7- 4,7 1,25-1,8 5,2- 5,8	2 8 1	- - -	- - -	- - -	- - -	Hjerpe 1979
Dana Manda	Kİ, 10 <sup>b</sup> Kİ, 10 <sup>b</sup>	- -	0,65 0,47	1,05 0,85	- -	2,24 2,40	- -	- -	Saurit ve ark 2002
Koyun	Dİ, 20 <sup>b</sup> Kİ, 20 <sup>b</sup>	38-45,4 -	- ~ 2,5	- 4	- -	2,05 -	- -	1,59 -	Ziv ve Sulman 1972, 1973
Koyun	Dİ, 15 <sup>b</sup> Kİ, 15 <sup>b</sup>	- -	- 2,58	- 3,29	- 73	4,75 -	6,89 -	2,74 -	Taha ve ark 1999

**Çizelge 1.3. (Devam) Tilozinin farklı hayvan türlerinde bazı farmakokinetik parametreleri (Lewicki 2006).**

Hayvan türü	Uygulama yolu ve dozu (mg/kg)	Proteine bağlanma oranı (%)	Doruk konsantrasyon C <sub>doruk</sub> (µg/ml)	Doruk konsantrasyona ulaşma zamanı T <sub>doruk</sub> (h)	Biyoyararlanım F (%)	Eliminasyon yarı ömrü t <sub>1/2el</sub> (h)	Toplam klirens Cl <sub>B</sub> (ml/min/kg)	Dağılım hacmi V <sub>d</sub> (l/kg)	Kaynaklar
Keçi	Dİ, 15 <sup>b</sup> Kİ, 15 <sup>b</sup>	- -	- 2,08	- 3,84	- 84	4,24 -	8,66 -	3,12 -	Taha ve ark 1999
Keçi	Dİ, 15 <sup>b</sup> Kİ, 15 <sup>b</sup>	- 37,6	- 2,4	- 4,19	- 72,6	3,04 -	6,8 -	1,7 Doku/ plazma Oranı 2,5	Atef ve ark 1991
Deve	Dİ, 10 <sup>b</sup> Kİ, 20 <sup>b</sup>	38,6- 47,7 26,8- 45,8 -	- 1,16 0,62	- ~0,5 ~1,5	88 41	0,92 1,52 3,71 2,73	239,28 39,73 -	11,93 3,88 -	Ziv ve ark 1995a
Domuz	Dİ, 10 <sup>c</sup> Kİ, 10 <sup>a</sup>	- -	1,0 -	- 1,5	- 95	4,52 24,49	26,8 -	14,6 -	Prats ve ark 2002a
Domuz	Kİ, 2,5 <sup>a</sup> Kİ, 10 <sup>a</sup>	- -	1,31 2,71	2,36 2,57	- -	3,88 3,01	- -	- -	Kim ve ark 2008

Dİ-damar içi; Kİ-kas içi; DA-derialtı; Tİ-intratracheal; <sup>a</sup>-tilozin baz; <sup>b</sup>-tilozin tartarat; <sup>c</sup>-tilozin fosfat; <sup>d</sup>-mastitisli inek; <sup>e</sup>-inek östrüsdü; <sup>f</sup>-inek luteal fazda; <sup>g</sup>-2 günlük buzağı; <sup>h</sup>-2 haftalık buzağı; <sup>i</sup>-6 haftalık buzağı; <sup>j</sup>-pnömonili buzağı

## Tilozinin Dokulardaki Kalıntısı

Avrupa İlaç Ajansı'nın (EMA) raporunda ve ülkemizde 28.04.2002 tarih ve 24739 sayılı Resmi gazetede yayınlanan 'Türk Gıda Kodeksi-Hayvasal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği (2002/30)' de tilozinin hayvansal kökenli gıdalardaki MKL belirlenmiştir (Çizelge 1.4.) (Resmi Gazete 2002, EMA 2002).

**Çizelge 1.4. Tilozinin dokulardaki MKL (Resmi Gazete 2002, EMA 2002).**

Farmakolojik Etkili Madde	Belirleyici Kalıntı	Hayvan Türleri	Maksimum Kalıntı Limiti	Hedef Organ
Tilozin	Tilozin A	Gıda üreten/ Üretilen bütün türler	100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg 50 µg/kg 200 µg/kg	Kas Yağ Karaciğer Böbrek Süt Yumurta

Sabah sağımlarını takiben üç gün boyunca günde bir kez 10 mg/kg dozunda Kİ tilozin uygulanan ineklerin sütlerinde birinci gün sabah sağımda 200-630 µg/kg, öğleden sonraki sağımda 90-330 µg/kg tilozin A kalıntısı ölçülmüştür. Son uygulamadan sonraki 3. günün sabah sağımında bir örnekte 60 µg/kg tilozin tespit edildiği, öğleden sonraki sağımda ise limit değerin (50 µg/kg) altında olduğu bildirilmiştir (EMA 1997).

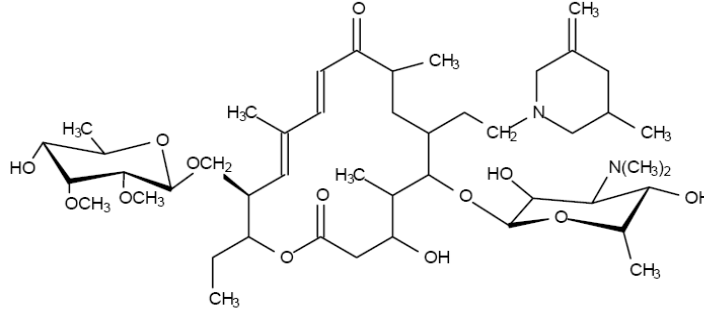
Dokudaki kalıntı seviyelerinde uygulama yolu belirleyici faktörlerdendir. Parenteral kullanıma göre oral yolla kullanım daha az kalıntıya neden olur. Domuz ve sığırlarda yapılan çalışmalar (Prats ve ark 2001, Prats ve ark 2002b) uygulama bölgesinde de yüksek konsantrasyonlarda kalıntı meydana geldiğini göstermektedir. Tilozinin enjekte edilebilir preparatlarının kullanımı sonucu uygulama bölgesi ve böbreklerde yüksek konsantrasyonlarda uzun süreli kalıntıya rastlanmıştır. Bununla birlikte oral kullanım sonucu da aynı durum karaciğer için geçerli olmaktadır (Botsoglou ve Fletouris 2000).

Tilozinin değişmemiş formu süt ve yumurtaya geçer. Avrupa İlaç Ajansı'nın raporuna göre tilozinin inek sütünde bulunmasına izin verilen MKL değeri 50 µg/kg olarak bildirilmiştir. Sığır, koyun ve keçi de parenteral uygulamada kesim öncesi

beletme ve sütü tüketmeme süresi sırasıyla 28 gün ve 8 sağımdır. Mikrobiyolojik olarak tilozin için KGA miktarı 360 µg/kişi olarak kabul edilmiştir (Kaya ve Bilgili 2000, EMEA 2002).

### 1.2.3. Tilmikosin

#### Yapısal zellikleri



**şekil 1.2.** Tilmikosinin kimyasal yapısı (MacNeil 2007).

Tilmikosin 16 üyeli (şekil 1.2), 20-deoxo-20-(3,5- dimethylpiperidin-1-yl) desmycosin yapısında yarısentetik makrolid bir antibiyotiktir. Desmycosinin C-20 aldehit gruplarının redüktif aminasyonu ile elde edilmiş, bu yapısal değişim ile Gram pozitif mikroorganizmalara yönelik etki spektrumunda genişleme ile antibakteriyel aktivitede artış sağlanmıştır (Kirst ve ark 1988, Debono ve ark 1989).

Tilmikosin % 85 cis ve % 15 trans izomerlerinin karışımından oluşmaktadır. Moleküler formülü  $C_{46}H_{80}N_2O_{13} H_3O_4P$ , moleküler ağırlığı 967,13 ve **pKa değeri 7,4- 8,6'**dır. Hekzan, aseton, asetonitril, kloroform, diklorometan, etil asetat, metanol, tetrahidrofuran gibi organik solventlerde (1500 mg/L veya daha büyük) rahat bir şekilde çözünür. pH 7 ve 25° C'de 566 mg/ml suda znr. Enjektabl formülasyonu, 300 mg/ml tilmikosin içeren viskz, sarı renkli bir sıvıdır. Işıktan korunarak çalışılmalıdır (Debono ve ark 1989, Stobba-Wiley ve ark 2000, Usp 2007, MacNeil 2007).

#### Etki Spektrumu ve Kullanımı

Tilmikosinin antibakteriyel aktivitesi, diğer makrolidlere benzer olarak ribozomların 50S alt birimine bağlanarak bakteriyel protein sentezinin

engellenmesiyle ortaya çıkar (Kaya 2000a). Antibakteriyel aktivitesinin yanı sıra oral yolla uygulamadan sonra hızla absorbe edilmesi, uzun bir yarı ömüre sahip olması ve dokulara penetrasyon yeteneğinin yüksek olması gibi farmakokinetik özellikleri solunum sistemi infeksiyonlarının tedavisinde rasyonel kullanımına olanak sağlamaktadır (Jordan ve ark 1996).

İlacın bazı bakteri türlerindeki EKEY'u *Staph.aureus* 0,78; *Strep. agalactia*, *Cl. perfringens* 3,12; *S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, *E.coli*  $\geq$  50; *P. Multocida* ve *P. Haemolytica*  $\leq$ 6,25, *Mycoplasma bovis* 0,25- 0,5  $\mu\text{g/ml}$ 'dir (Ose 1987, Ziv ve ark 1995b, Nickerson ve ark 1999, Kaya 2000a).

Tilmikosinin güvenli kullanımı birkaç hayvan türü ile sınırlı olmasına rağmen, özellikle besi sığırlarında ve kuru dönemdeki süt sığırlarında pasteurella ve mikoplasma türlerinin neden olduğu solunum sistemi infeksiyonlarına karşı uzun süreli sağaltıcı ve koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Gorham ve ark 1990, Ramadan 1997, Modric ve ark 1998).

İlaç sığır (Ziv ve ark 1995b), buzağı (Morck ve ark 1997, Frank ve ark 2000), koyun (Modric ve ark 1998, Naccari ve ark 2001) ve domuzlarda (Wallgren ve ark 1999) *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus pleuropneumonia* ve *Mycoplasma* türleri ile ilişkili pneumonilerde koruyucu ve tedavi edici olarak kullanılır (Stobba-Wiley ve ark 2000, MacNeil 2007). Bu amaçla 10 mg/kg dozda DA yolla uygulanır; bu miktar 30 mg/kg'a kadar artırılabilir. Sağaltım için genellikle tek uygulama yeterlidir (Botsoglou ve Fletouris 2000, Kaya 2000a, MacNeil 2007).

Sığır, koyun ve domuzlarda kullanım için enjektabl formülasyonu ve domuzlar için premiks formülasyonu mevcuttur. Sığır ve koyun için tavsiye edilen doz DA yolla 10 mg/kg c.a.'dır (Kaya 2000a, Usp 2007).

## Farmakokinetiği

Tilmikosinin farmakokinetiği genel grup özelliklerine benzer. İlaç parenteral yolla uygulanır. İlaç tercihen DA olmakla birlikte Kİ yolla da verilir. İlaç bu yollarla verildiğinde yaklaşık 60 dk'da plazmada doruk yoğunluğa (normal dozlarda 0,8- 1,7 µg/ml) ulaşır. Tilmikosin özellikle akciğerlerde birikir, buradaki yoğunluğu plazmadakinin 50–60 katına kadar çıkabilir. Tek doz halinde verildiğinde öncelikle akciğerlerde olmak üzere 3-4 gün süreyle etkili yoğunluklarda kalır. İlaç vücutta başlıca desmetiltilmikosine çevrilir; değişmemiş ve metabolitleri halinde vücudu öncelikle safrayla terk eder. İdrarla da atılır. Sığırlarda tilmikosinin derialtı uygulama sonrası % 24 idrar % 68 gaita ile atılır. İlaç uygulama yerinde ve vücutta uzun süre kalır. Uygulama yerinde yaklaşık 1 ay sonra bile 5 ppm, karaciğer ve böbreklerde 0.3 ppm miktarlarında bulunabilir (Scoreaux ve Shryock 1999, Botsoglou ve Fletouris 2000, Kaya 2000a, Clark ve ark 2004).

Scoreaux ve Shryock (1999) radyoaktif maddeyle işaretli tilmikosin kullanarak yaptıkları çalışmada inkubasyonun 4. saatinde tilmikosin birikiminin alveolar makrofajlarda (Hi/Hd= 193) monosit (Hi/Hd= 43), nötrofil (Hi/Hd= 13) ve meme epitel hücrelerine (Hi/Hd= 20) göre 4-13 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Subselüler dağılım tilmikosinin % 70-80'i lizozomlara lokalize olduğunu göstermektedir. Meme bezi hücrelerine tilmikosinin ulaşması hücrenin canlılığına, ısı ve pH'ya bağlıdır. Metabolik inhibitörler veya oksijensizlikten ise etkilenmez. Bununla birlikte *in vitro* olarak lipopolisakkaride maruz bırakıldığında meme makrofajlarında ve epitel hücrelerinde tilmikosin konsantrasyonunun arttığı bildirilmektedir (Scoreaux ve Shryock 1998).

Tilmikosinin hızlı dengeye ulaşması ve geniş doku dağılımı yanında, Dİ ve DA kullanımı sonrası süt ile yavaş atılımı karakteristik kinetik özellikleri arasındadır. Bu özellikler nedeniyle laktasyondaki hayvanlarda kullanılmaz. Uygulama sonrası 14-21. günlerde dozun yaklaşık % 90'ı atılmaktadır (Botsoglou ve Fletouris 2000).

Koyunlarda farklı dozlarda DA tilmikosin verilmesi sonucu elde edilen bazı kinetik değerler Çizelge 1.5' de verilmiştir.

**Çizelge 1.5. Koyunlarda farklı dozlarda DA tilmikosin verilmesi sonucu elde edilen bazı kinetik değerler (MacNeil 2007).**

Farmakokinetik Parametreler	Doz (mg/kg)			
	10,0	30,0	100,0	150,0
C <sub>doruk</sub> (mg/mL)	0,44	1,14	2,15	2,50
T <sub>doruk</sub> (h)	8	12	24	36
EAA (mg/h/ml)	10	35	120	185

Tilozin ve diğer makrolidler gibi tilmikosin de zayıf organik baz olduğundan meme alveoler dokusunda ve sütte yoğunlaşır (Helton-Groce ve ark 1993). Tilmikosin hızlı ve yüksek oranda kandan süte geçer, sığırlarda 8-24 saat arasında sütte pik seviyeye (6-8 µg/ml) ulaştığı, süt yarı ömrünün ise 34 saat olduğu bildirilmiştir (EMEA 1999).

Tilmikosinin akut toksik etkileri; kazayla bir kimseye toksik dozda tilmikosin enjekte edilirse taşikardi ve akut kardiyal yetmezlik gözlenmektedir. Sığır, at ve insanlarda enjeksiyon bölgesinde irritasyona neden olabilir ve bölgede ödem şekillenebilir (Jordan ve ark 1993, Clark ve ark 2007).

Tilmikosinin karsinojenik potansiyeli düşüktür, genotoksik değildir ve fertiliteye bir yan etkisi yoktur. DA tek doz sığırlarda iyi tolere edilir. Yüksek dozlarda taşikardi, elektrokardiogramda değişiklikler gibi kardiyovasküler etkiler gözlenmektedir. Sığırlarda en yüksek non-toksik doz 30 mg/kg iken bu doz domuzlarda nefes alıp vermede artış, çarpınma ve ölüme sebep olabilir. At ve koyunlar tilmikosinin toksik etkilerine sığırlardan daha hassastırlar (Jordan ve ark 1993).

#### **Tilmikosinin Dokulardaki Kalıntısı**

Avrupa İlaç Ajansı'nın raporunda ve ülkemizde 28.04.2002 tarih ve 24739 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan 'Türk Gıda Kodeksi-Hayvasal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği (2002/30)'de tilmikosinin hayvansal kökenli gıdalardaki MKL belirlenmiştir (Çizelge 1.6) (EMEA 1999, Resmi Gazete 2002).

**Çizelge 1.6. Tilmikosin dokulardaki MKL (EMEA 1999, Resmi Gazete 2002).**

Farmakolojik Etkili Madde	Belirleyici Kalıntı	Hayvan Türleri	Maksimum Kalıntı Limiti	Hedef Organlar	Diğer Talimatlar
Tilmikosin	Tilmikosin	Sığır	50 µg/kg	Kas Yağ	
		Domuz	50 µg/kg		
		Koyun	1000 µg/kg	Karaciğer Böbrek	
		Koyun	1000 µg/kg		
Koyun	50 µg/kg	Süt			
Tavuk	75 µg/kg	Kas Deri-Yağ Karaciğer Böbrek	İnsan tüketimi için üretilen yumurtacı hayvanlarda kullanılmaz		
	75 µg/kg				
	1000 µg/kg				
	250 µg/kg				
		İnek	50 µg/kg	Süt	

Enjeksiyon bölgesinde önemli miktarda tilmikosin kalıntısı bulunabilir. Sığırlarda yapılan çeşitli çalışmalarda (Van Donkersgoed ve ark 2000, Jiang ve ark 2006) kesim öncesi bekletme süresi olan 28. günden sonra tilmikosin (0,87- 1,75 mg/kg) kalıntısı belirlenmiştir. Tüm türlerde bildirildiği üzere kalıntının büyük kısmı ana bileşenden ibarettir ve çoğu karaciğerde olmak üzere böbrekte de birikir. Belirteç kalıntı olarak tilmikosin tavsiye edilir. Karaciğer izleme programlarında hedef doku olarak önerilmekte, ancak böbrek de alternatif olarak kabul edilmektedir (EMEA 1999).

Tilmikosinin antimikrobiyal spektrumu, meme bezi içerisindeki birikme yeteneği, yavaş salınımı ve düşük doz hacimli formülasyon karakteri gibi üstünlükleri, ilacın laktasyondaki ineklerde mastitisin tedavisi için oldukça cazip hale getirdiğinden veteriner hekimlerce etiket dışı kullanımlara rastlanmaktadır (Helton-Groce ve ark 1993).

Helton-Groce ve ark (1993), ineklere tek doz DA (10 mg/kg) tilmikosin uygulamasını takiben sütteki pik konantrasyonu 9,7- 17,00 µg/kg olarak hesaplanmış, 19.-31. günlerde sütteki tilmikosin 25 ppb seviyesinden yüksek olduğunu ve 31. güne kadar sütte (0,027 µg/ml) HPLC ile ilacı tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Avrupa İlaç Ajansı'nın raporuna göre tilmikosinin inek sütünde bulunmasına izin verilen MKL'i 50 µg/kg olarak bildirilmiştir. Sığırlarda parenteral kullanım



sonrası kesim öncesi bekleme süresi 60 gündür. İnsan tüketimi için süt elde edilen ineklerde kullanılmaz. Mikrobiyolojik olarak tilmikosin için KGA miktarı 240 µg/kişi olarak kabul edilmiştir (EMEA 1999, Botsoglou ve Fletouris 2000, Kaya 2000)

Bu çalışmanın amacı makrolid grubu antibiyotiklerden tilosin ve tilmikosinin süt ve serumda zenginleştirme yolu ile yüksek basınçlı likit kromatografi-UV (HPLC-UV)'de metot validasyonunun yapılması ardından, klinik olarak sağlıklı Holştayn ırkı ineklere tilosin 17,5 mg/kg dozunda Kİ, tilmikosin 10 mg/kg dozunda DA uygulanarak elde edilecek pozitif serum ve süt örneklerinde seviyelerinin ve bazı farmakokinetik parametrelerinin belirlenmesi ile sütteki kalıntılarının değerlendirilmesidir.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

- ✓ Derin dondurucu (-20 °C, Arçelik, Türkiye)
- ✓ Buzdolabı (-4 °C, Arçelik, Türkiye)
- ✓ pH metre (İnolab, WTW series, Terminal 740, Germany)
- ✓ Manyetik karıştırıcı (Gerhardt Bonn, Germany)
- ✓ Saf su sistemi (ELGA, Purelab Ultra, Ultra Genetic, England)
- ✓ Santrifüj (Sigma, 3K 18, Germany)
- ✓ Terazı (Metler Toledo, AG204, Switzerland)
- ✓ Ultrasonik su banyosu (Elma, Transsonic Digital, ST 840 DH, Germany)
- ✓ Uçurucu (TurboVap II evaporator, Zymark Corporation, Hopkinton, USA)
- ✓ Vorteks (Thermolyne, Type 37600 mixer, USA)
- ✓ Solid faz ekstraksiyon için vakum manifold sistem (Alltech)
- ✓ Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi UV dedektörlü (HPLC-UV,CBM-20 A prominence communications bus module, SİL-10A Shimadzu Auto İnjektor, LC-10AD shimadzu Liquid Chromatograph, DGU-14A Degasser, SPD-10A UV-VIS Detector, CTD\_10A Column Oven, USA)
- ✓ Kolon (Waters, 5 µ C18, 250 x 4.60 mm id Spherisorb Phenyl)
- ✓ PTFE membran (Bio-crom, 47 mm \* 0,45 µm, Sartolon polyamid)
- ✓ Naylon membran (Bio-crom, 47 mm \* 0,45 µm, Sartolon polyamid)
- ✓ Şırınga filtre PTFE membran (VWR, 13 mm\* 0,45 µm, USA)
- ✓ SPE kartüş (Waters Sep-Pak Plus C<sub>18</sub>, Part No: WAT020515)
- ✓ Koyu renkli likit kromatografi viyalleri
- ✓ Vakumlu cam kan tüpü ( Plain, 10 ml, Türkiye )
- ✓ Santrifüj tüpü (15 ml ), plastik tüp (10 ml)
- ✓ 2.5 ml'lik şırınga
- ✓ Ölçülü plastik kaplar
- ✓ Tekmelik, muşet

## 2.2. Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

- ✓ Asetonitril (Merck), metanol (Merck), glasiyal asetik asit (% 100, Merck), amonyum hidroksid (% 30, Merck), potasyum dihidrojen fosfat (Merck), ortho fosforik asit (% 100, Merck), ultra saf su (18 mΩ), tilmikosin (Sigma), tilozin tartarat (Sigma) kullanıldı.
- ✓ Hayvanlara uygulama için tilmikosin preparatı olarak Micotil® 300 enjeksiyonluk çözelti (Tilmikosin 300 mg/ml, 50 ml, Lilly İlaç Tic. Ltd. Şti., Türkiye), tilozin preparatı olarak da Tylan® 200 enjeksiyonluk çözelti (Tilozin 200 mg/ml, 50 ml, Lilly İlaç Tic. Ltd. Şti., Türkiye) kullanıldı.
- ✓ Mobil faz A: fosfat buffer solüsyon 25 mM olarak hazırlanır ve ortho fosforik asit ile pH 3,4'e ayarlandı. PTFE filtreden geçirildi ve degaze edildi.
- ✓ Mobil faz B: % 100 asetonitril PTFE filtreden geçirildi ve degaze edildi.
- ✓ Örnek dilüsyon karışımı: fosfat buffer solüsyon 50 mM (pH 4,5) - asetonitril (70/30) pH 5,9 olacak şekilde ayarlandı.
- ✓ % 5'lik amonyum hidroksit su ile hazırlandı (5+95).
- ✓ % 5'lik glasiyel asetik asit metanol ile hazırlandı (5+95).
- ✓ % 25'lik asetonitril su ile hazırlandı (25+75).
- ✓ 0,1 M amonyum asetat metanolde hazırlandı (2+2).
- ✓ Tilmikosin ve tilozin için stok solüsyonlar 1000 µg/mL olacak şekilde metanolde çözdürülerek hazırlandı ve çalışma süresince ışıktan korunarak +4 °C'de bekletildi.
- ✓ Çalışma stok solüsyonları 0,01- 0,015- 0,02- 0,025- 0,0375- 0,05- 0,1- 0,5- 1, 5, 10, 50 ve 100 µg/mL olacak şekilde örnek dilüsyonlar hazırlandı.
- ✓ Sıvı kromatografisine uygulanmadan önce tüm solüsyon ve çözeltiler naylon membran (47 mm \* 0,45 µm) filtreden, kimyasallar PTFE (47 mm \* 0,45 µm) filtreden geçirildi.

## 2.3. Hayvan Materyali

Çalışma, mikroskopik sayım yöntemi ile sütlerinde somatik hücre sayısı ≤ 500.000 olan sağlıklı 12 adet sütçü inek (Holştayn ırkı, 350-400 kg, 3-4 yaşında, ortalama günlük süt verimi 18-22 kg) üzerinde gerçekleştirildi.

Hayvanlara herhangi bir ilaç uygulamasını önlemek için 1 ay boyunca aynı şartlarda bakım ve beslemeye alındı. Hayvanlara besleme süresince konsantre yem olarak sığır besi yemi ve kaba yem olarak saman verildi.

Deneysel uygulamalar özel bir işletmede (Konya) gerçekleştirildi.

Denemeye başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay (No: 2007/064) alındı (Bkz. EK-A).

#### **2.4. Deneysel Uygulamalar**

Hayvanlar rastgele 6'şarlı 2 gruba ayrıldı. Birinci gruba 10 mg/kg dozunda tilmikosin (Micotil® 300 enj.) boyun bölgesi dorsolateralinden DA yolla, ikinci gruba 17,5 mg/kg dozunda tilozin (Tylan® 200 enj.) boyun bölgesi dorsolateralinden Kİ yolla uygulandı.

Uygulamalar sabah sağımindan sonra 06.00-07.30 saatleri arasında yapıldı. İlaç uygulama öncesi (0) ve takibeden 10, 20 ve 40 dakikalar ile 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde *V. jugularis*'den vakumlu steril tüplere kan örnekleri (10 ml) toplandı. Örnekler bir saat içinde 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen serumlar analiz edilene kadar -20 °C'de saklandı.

İlaç uygulama öncesi (0) ve takibeden 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde her örnekleme zamanında meme tamamen boşaltılacak şekilde elle sağılarak steril tüplere süt örnekleri (100 ml) toplandı, soğuk zincire dikkat edilerek laboratuara getirilen örnekler analiz edilene kadar -20 °C'de saklandı.

#### **2.5. Sütlerde Somatik Hücre Sayımı**

Somatik hücre sayımı 91/180 no'lu Avrupa Birliği direktifine göre Breed metodu ile metilen mavisi (0,6 g), % 96'lık etil alkol (54 ml), trikloretan (40 ml) ve glasiyal asetik asit (6 ml)' ten oluşan boya solüsyonu ile mikroskopik olarak yapıldı.

Somatik hücre sayımı lam üzerinde 10 µl örneğin yayıldığı ve boyandığı 5×20 mm'lik alanın uzun hattı boyunca ortadaki 1/3'lük bölgede en az 20 görüş

sahasındaki hücrelerin sayılması ile gerçekleştirildi. Örneklerdeki somatik hücre sayısı (adet/ml) aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$S = M \times \text{ÇF} \times 100$$

Bu formülde; S: örnekteki somatik hücre sayısını, M: görüş sahalarındaki ortalama hücre sayısını, ÇF: kullanılan mikroskobun çalışma faktörünü ifade etmektedir. Mikroskobun çalışma faktörü milimetrik lam kullanılarak hesaplandı.

## **2.6. Serum Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması**

Tilmikosin ve tilozinin serum konsantrasyonları Moran ve ark (1997) ve Garcia-Mayor ve ark (2006) tarafından bildirilen metotlar modifiye edilerek HPLC-UV'de ölçüldü. Derin dondurucudan çıkartılan serum örneği oda ısısında çözündürülüp 2 ml serum 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılarak, 3000 rpm (1500 g) 15 dk +4° C'de santrifüj edilerek olası partiküllerden arındırıldı. C<sub>18</sub> SPE kartuş önce 2 ml metanol, sonra 4 ml su ile şartlandırıldı. SPE kartüşe 2 ml serum örneği uygulandı ve vakum akış hızı 0,5- 1,5 ml/dk ayarlandı. SPE kartüş sırasıyla 2 ml su, 3 ml amonyum hidroksit-su (5+95), 2 ml su ile yıkandı. SPE kartüşündeki tilmikosin 2 ml asetik asid-methanolle (5+95), tilozin 2 ml 0,1 M amonyum asetatla 10 ml'lik tüplere toplanarak 45 °C'de nitrojen altında uçuruldu. Rezidüye 1 ml örnek dilüsyon karışımı eklenerek 15-20 sn ultrasonik su banyosunda ardından da 10-15 dk dışarda bekletilerek çözündürüldü. Daha sonra 0,45 µm'lik şırınga filtreden geçirilerek LC viyallere alındı ve 20 µl'si sisteme uygulandı.

## **2.7. Süt Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması**

Tilmikosin ve tilozinin süt konsantrasyonları Dudrikova ve ark (1999), Stobba-Wiley ve Readnour (2000) ve Garcia-Mayor ve ark (2006) tarafından bildirilen metotlar modifiye edilerek HPLC-UV'de ölçüldü. Süt örneklerinin oda ısısında çözünmesinden sonra 40 °C'deki su banyosunda 3 dk homojenize edildi. 50 ml'lik santrifüj tüpüne 10 ml süt konarak üzerine proteinlerin denatürasyonunu sağlamak amacıyla 30 ml asetonitril eklenerek 30 sn vortekste karıştırıldı. Ultrasonik banyoda 30 sn homojenizasyon sonrası 25 °C'de 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ölçülü beherlere aktarıldı ve 120±1 ml su ile dilue edildi. C<sub>18</sub>

SPE kartuş 10 ml metanol ve 10 ml su ile şartlandırıldı. Örnek kartuşe uygulandı ve akış hızı en fazla 8 ml/dk olacak şekilde ayarlandı. Kartuş önce 10 ml su sonra 10 ml % 25'lik asetonitril ile yıkandı. Yıkama sonrası yüksek basınçla (5 in./130 mm Hg' den az) 1 dk boyunca kartuş kurutuldu ve vakum kapatıldı. Kartuşün ucuna 2.5 ml'lik şırınga takılarak tilmikosin 3 ml % 5 glacial asetik asitle, tilozin 4 ml 0,1 M ammonyum asetatla piston yavaşça itilerek analitler toplandı. 30 °C'de nitrojen altında uçuruldu. Rezidüye 1 ml örnek dilüsyon karışımı eklenerek 15-20 sn ultrasonik su banyosunda, 10-15 dk dışarda bekletilerek çözdürüldü. Daha sonra 0,45 µm şırınga filtreden geçirilerek LC viyallere alınarak 50 µl'si sisteme uygulandı.

## 2.8. Tilmikosin ve Tilozinin Miktar Tayinleri

Tilmikosinin ve tilozin kantitatif tayinleri HPLC-UV'de gerçekleştirildi (Garcia-Mayor ve ark 2006).

Kolon	:	Phenomenex Gemini 5 µ C18, 11ØA, 250 x 4,60 mm		
Kolon sıcaklığı	:	25 °C		
Mobil faz	:	Mobil Faz A: 0,025 M KHPO <sub>4</sub> pH: 3,4 Mobil Faz B: Asetonitril		
LC gradient koşulları	:	<b>Zaman</b>	<b>Mobil faz</b>	
		(dk)	% A	% B
		0,0	80	20
		3,0	40	60
		11,0	20	80
		30,0	20	80
Akış hızı	:	1 ml/dak		
Dalga boyu	:	287 nm		
Dedektör	:	UV		
Enjeksiyon hacmi	:	Süt: 50 µl, Serum: 20 µl		
Alıkonma zamanları	:	Tilozin	~ 9. Dk	
		Tilmikosin	~ 10. Dk	
Kolon yıkama koşulları	:	su - asetonitril (50:50, v/v), 0,05 ml/dk. akış hızında		

## 2.9. Metot Validasyonu

Özgünlük ve seçicilik; doğrusallık ve ölçüm aralığı; geri kazanım ve doğruluk; duyarlılık (gözlenebilirlik sınırı ve ölçülebilirlik sınırı); kesinlik metot validasyonunun belirlenmesinde performans ölçütleri olarak kabul edildi (Botsoglou ve Fletouris 2000, Şenyuva ve Gilbert 2006, Üney 2008).

### 2.9.1. Özgünlük (Specificity) ve Seçicilik (Selectivity)

Özgünlük, bulunması muhtemel diğer bileşenlerin (parçalanma ürünleri, ortam bileşenleri vb.) varlığında, istenilen analiti açık bir şekilde gözlemleyebilme yeteneğidir. Tayin edilecek maddelerin analiz sonuçları ortamda bulunan başka maddelerden etkilenmemelidir.

Seçicilik, birden fazla analite karşı duyarlı metotlarda kullanılır. Bir analitik metot, girişim yapan başkaca bileşenlerin varlığı ve bilinen yan ürünlerin bulunduğu durumlarda da istenilen analiti ayırt edebilme yeteneğine sahip olmalıdır.

Ana maddeleri içermeyen serum (boş serum) ve süt (boş süt) kullanılarak kromatogramda tilozin ve tilmikosinin alıkonma zamanlarında serum, süt ve diğer kaynaklı piklerin girişim yapıp yapmadığı incelendi.

### 2.9.2. Doğrusallık (Linearity)

Bir analitik prosedürün doğrusallığı (belirli sınırlar içerisinde) ölçülen analitin konsantrasyonu (miktar) ile dedektör cevabının ne derece doğru orantılı olduğu ile belirlenir. Diğer bir deyişle, bir metodun doğrudan veya bir matematiksel formül üzerinden analit konsantrasyonuna oranla sonuç verebilirliğidir. En basit uygulanabilir regresyon eşitliği kullanılabilir.

Çalışma boyunca kullanılan standartlar, stok solüsyonların 0,01- 0,015- 0,02- 0,025- 0,0375- 0,05- 0,1- 0,5- 1, 5, 10, 50 ve 100 µg/ml dilüsyonları şeklinde günlük olarak hazırlandı. Standartların pik alanları tayin edildi. Konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizildi ve korelasyon katsayıları hesaplandı.

### 2.9.3. Doğruluk (Accuracy) ve Geri kazanım (Recovery)

Bir analitik metodun doğruluğu ölçülen değer (konsantrasyon) ile gerçek değer arasındaki yakınlığı gösterir. Doğruluk genellikle, bilinen değerlerin geri kazanımı, eklenmiş miktar veya ortalama değer ile gerçek değer arasındaki farkın güven aralıkları olarak rapor edilir. Ancak katım yapılmış bir numune ile doğal kontamine numunenin aynı şey demek olmadığı da bilinmelidir. Doğruluğun ideal ölçümü elde edilen ölçüm ile sertifikalı referans materyalin (CRM) değerinin karşılaştırılması ile yapılır, ancak bu materyalleri bulabilmek çoğu kez mümkün değildir.

Bir analitin geri kazanım oranı, o analitten numune ortamına eklenen miktarın ortaya çıkardığı dedektör cevabının saf orjinal standardın cevabına oranıdır. Geri kazanım bir analitik metodun ekstraksiyon verimliliğini ölçerken, belirli limitler içerisindeki sapmalar dikkate alınarak, numune saflaştırma sırasında ortaya çıkan kayıpları da gösterir. % geri kazanım: ölçülen değer/teorik değer\*100 olarak ifade edilir.

Ana madde içermeyen serum örneklerine tilozin ve tilmikosin içeren standart solüsyonların farklı miktarları (20, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 10 000 ng/ml) eklendi. Ana madde içermeyen süt örneklerine tilozin ve tilmikosin içeren standart solüsyonların farklı miktarları (10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 10 000 ng/ml) eklendi. Geri kazanımları, herhangi bir numune gibi değerlendirilen serum ve süt örneklerinde tayin edilecek maddelerin pik alanlarının standartların pik alanları ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı.

### 2.9.4. Duyarlılık (Sensitivity)

Bir analitik yöntemin saptayabildiği en küçük konsantrasyon değeri olup gözlelenebilirlik sınırı [limit of detection (LOD)] ve ölçülebilirlik sınırı [limit of quantification (LOQ)] olarak ifade edilir. LOD, analit sinyalinin geri plan gürültüden ayrılabilmesi için gereken en az analit miktarıdır. LOQ, analitin güvenilir bir şekilde doğru ölçümünün yapılabilmesi için gerekli en düşük miktardır. Tespit limiti olarak kromatogramın temel çizgisi üzerinde maddelerin oluşturdukları sinyallerin geri plan gürültüye oranının (S/G) 3 olduğu konsantrasyon, hesaplanabilir limit olarak ise S/G oranının 6 olduğu konsantrasyon düzeyi baz alındı.



Boş serum ve süt örnekleri tilmikosin ve tilozinin en düşük standart solüsyonları (10, 15, 20, 25, 50, 100 ng/ml) ile yüklendi. Kromatogram üzerinde S/G oranı 3 olan konsantrasyon LOD, S/G oranı 6 olan konsantrasyon LOQ olarak tespit edildi.

Boş numuneleri analiz ederek en yüksek hassasiyet seviyesindeki gürültü değerlerinin standart sapmasını hesaplanması başka bir yöntemdir. Gürültünün standart sapması 2 veya 3 ile çarpılarak LOD'nin sayısal değeri belirlenir. LOD'nin teyid edilmesi için belirlenen düzeyde bir standardın hazırlanarak analizinin yapılması akılcı bir yaklaşım olacaktır. LOQ'nun 9:1 sinyal-gürültü oranı veren en düşük dedektör cevabı olarak belirlenmesidir. Bu nedenle LOQ, LOD'nin 3 katı olarak kabul edilir.

#### **2.9.5. Kesinlik (Precision)**

Bir analitik prosedürün kesinliği, önceden tanımlanmış şartlarda birden çok kez alt numuneleri alınan homojen bir numuneden yapılan ölçümlerin birbirleriyle uyumudur (dağılım oranı). Kesinlik, istatistiksel olarak yeterli sayıda (ör.  $\geq 10$ ) numuneden elde edilen ölçümlerin bağıl standart sapmalarının yüzdeleridir (%VK).

Bir analitik metodun birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlık derecesinin ifadesidir. Kesinlik parametresi standart sapma ve/veya varyasyon katsayısıyla ifade edilir. Analitik yöntemin kesinliğinin belirlenmesi için istatistiksel açıdan yeterli sayıda aynı konsantrasyona sahip örnekler kullanılarak ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları tayin edilir.

Kesinlik için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik (repeatability) ölçütü olarak kullanıldı. Tekrarlanabilirlik (r), kısa bir zaman aralığında aynı uygulama şartları altındaki kesinliği ifade eder. Bu nedenle; aynı analist, aynı ekipman, tekrar analizler arasında yakın zaman aralıkları, aynı kimyasallar, aynı laboratuvar vs. kullanılarak yapılan ölçümlerin kesinliğidir.

Gün içi ve günler arası farklılığın tespiti için standart solüsyonların ölçüm aralığında yer alan 3 farklı miktarı (süt için 50, 100, 500 serum için 100, 500, 1000 ng/ml) ana madde içermeyen serum ve süt örneklerine eklendi. Her düzeyde 6 tekrarlı analiz yapıldı. Bu kademeler 3 farklı günde tekrarlandı. Tüm örneklerde konsantrasyon tayin edildi. Zenginleştirilmiş serum ve süt örneklerindeki konsantrasyonlar üzerinden ortalama, standart sapma ve % varyasyon katsayısı hesaplandı. Tekrar edilebilirlik, pik alanlara karşılık gelen konsantrasyonların % varyasyon katsayılarınının 15'den küçük olmasına göre değerlendirildi.

## 2.10. Farmakokinetik Hesaplamalar

Her hayvanda tilozin ve tilmikosinin serum ve süt konsantrasyon-zaman eğrileri WinNonlin (WinNonlin® Professional Version 4.1, Pharsight Corporation, Scientific Consulting Inc., North Carolina, USA) programı yardımıyla hazırlandı. Her iki ilaç içinde en uygun farmakokinetik model bireysel serum konsantrasyon-zaman eğrilerinin direk bakışı ve AIC (Akaike Information Criteria) temel alınarak belirlendi (Yamaoka ve ark 1978). Her hayvanın serum tilozin (Kİ uygulama yolu) ve tilmikosin (DA uygulama yolu) için farmakokinetik değişkenleri iki kompartmanlı dışa açık modele uygun olduğu görüldü. Sütteki farmakokinetik değişkenleri ise non-kompartman model analizi ile hesaplandı.

Tilozin ve tilmikosinin doruk konsantrasyon ( $C_{\text{doruk}}$ ) ve doruk konsantrasyona ulaştığı zaman ( $t_{\text{doruk}}$ ) değerleri her hayvanın serum ve süt konsantrasyon-zaman eğrisi üzerinde direkt bakı (gözlem değerlerinden) ile tayin edildi. Her antibiyotik için  $C_{\text{doruk}}$  değerleri ortalama $\pm$ SD ,  $t_{\text{doruk}}$  değerleri ise median olarak belirtildi.

## 2.11. İstatistiksel Analiz

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. Zaman parametreleri ( $t_{1/2ab}$ ,  $t_{1/2\alpha}$  ve  $t_{1/2\beta}$ ) için harmonik ortalama $\pm$ SD hesaplandı. Her iki ilaç için serum ve süt konsantrasyonları,  $C_{\text{doruk}}$  ve EAA parametreleri arasındaki istatistiksel farklılıklar SPSS 15.0 (SPSS for Windows Evaluation Verison, SPSS Inc., LEAD Tech., USA) istatistik paket programı kullanılarak *Paired Samples T* testi ile değerlendirildi.  $t_{1/2\beta}$

için ise istatistiksel farklılık nonparametrik *Wilcoxon Signed Rank* testi ile değerlendirildi.

Tilozin ve tilmikosin için metodun gün içi ve günler arası farklılıklarının ifadesi olarak standart sapma ve % varyasyon katsayısı dikkate alındı. Tekrarlı analizlerde belirlenen konsantrasyonlar üzerinden tanımlayıcı istatistik yapılarak ortalama $\pm$ SD ve % varyasyon katsayısı hesaplandı.

Tüm analizlerde güven aralığı %95 olarak kabul edildi. İstatistiksel anlamda önemlilik sınırı olarak  $P<0.05$  değeri alındı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Sütlerdeki Somatik Hücre Miktarı

Deney için belirlenen özel işletmede sağmal ineklerden alınan süt örnekleri soğuk zincir koşullarına dikkat edilerek 2 saat içerisinde laboratuara getirilerek somatik hücre sayımı ve pH ölçümü yapıldı (Çizelge 3.1). Çiğ süt örneklerindeki ortalama somatik hücre sayısı 22.08.2006 tarih ve 26267 sayılı Resmi gazetede yayınlanan “TGK Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği (2006/38)”inde belirtilen kritere göre değerlendirildi. Sağlıklı bir meme için somatik hücre sayısı  $\leq$  500 000 olan inekler seçildi.

**Çizelge 3.1. Çiğ süt örneklerindeki somatik hücre miktarı.**

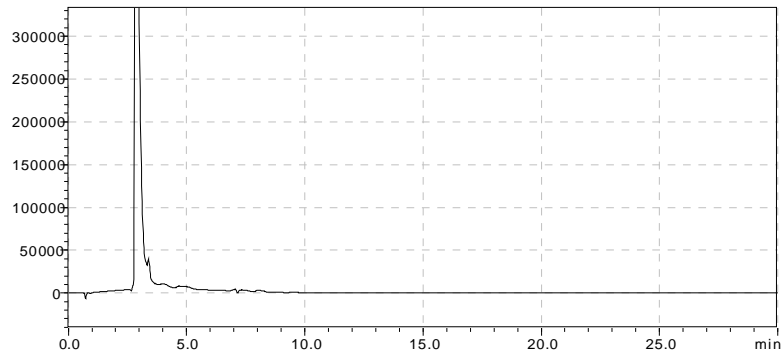
Parametreler	En düşük	En yüksek	Ortalama
Somatik hücre sayısı (adet/ml)	$3,5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$
pH	6,4	6,8	6,55

#### 3.2. Metot Validasyonu

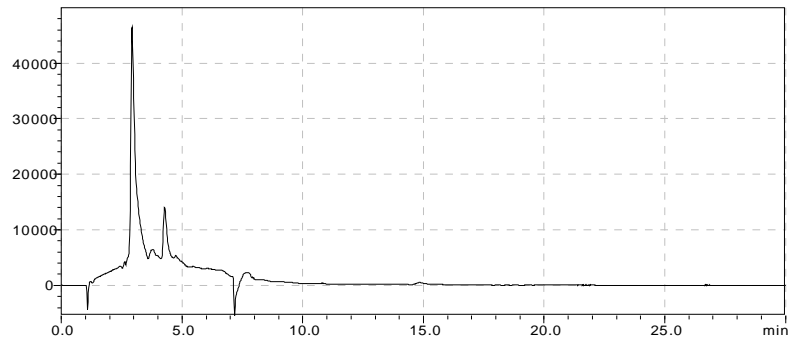
##### 3.2.1. Özgünlük

Ana maddeleri içermeyen süt ve serum örneklerinin HPLC sistemine uygulanması sonrasında kromatogram üzerinde tilmikosin ve tilozin alıkonma zamanlarında süt ve serum kaynaklı piklere rastlanmadı (Şekil 3.1).

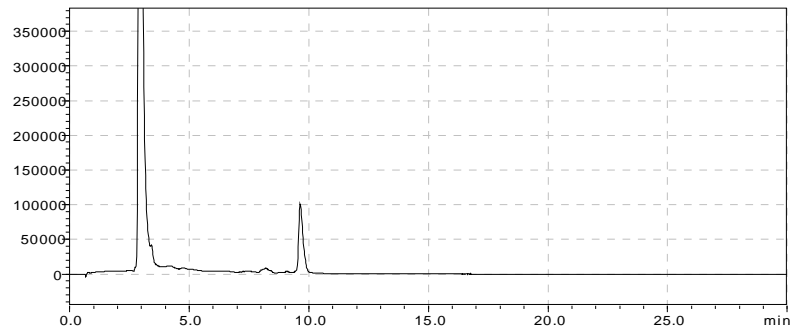
A



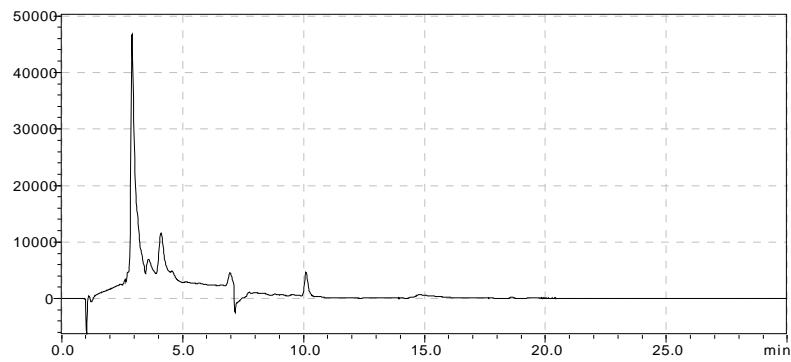
B



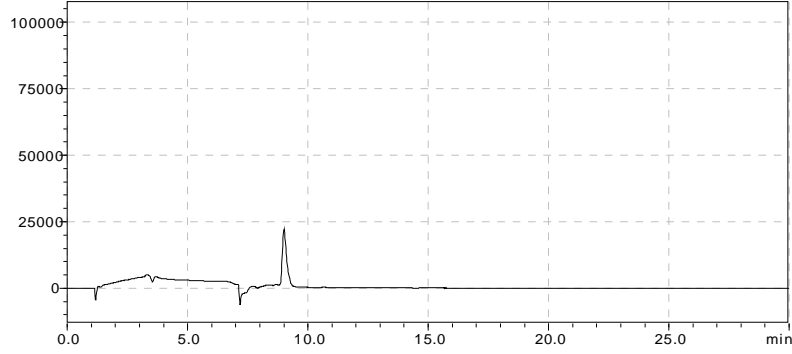
C



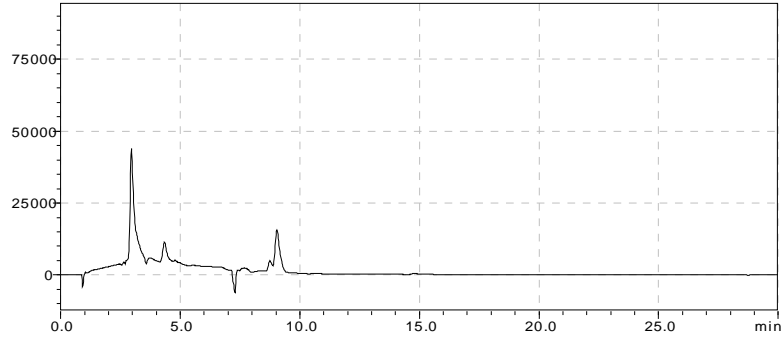
D



E



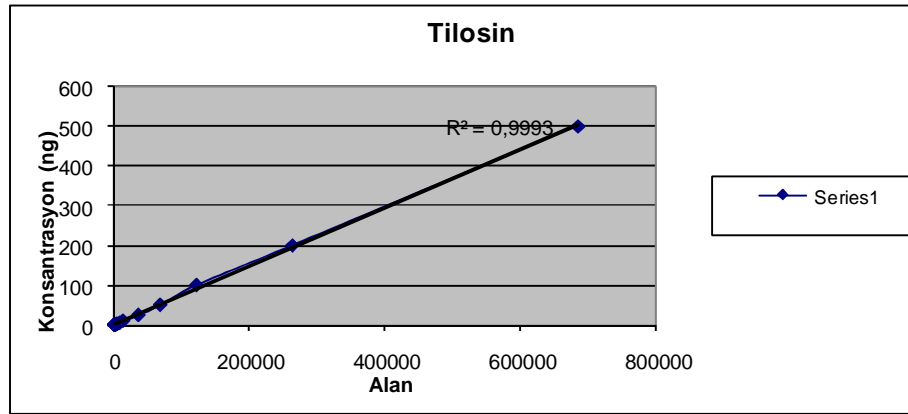
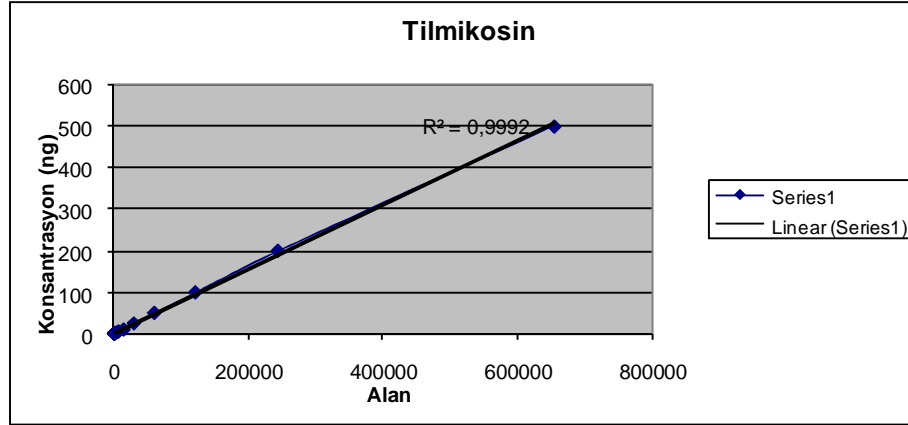
F



**Şekil 3.1.** Tilmikosin ve tilozinin HPLC kromatogramları, A; boş süt örneği B; boş serum örneği, C; 8. saat tilmikosin süt örneği D; 1. saat tilmikosin serum örneği E; 4. saat tilozin süt örneği F; 2. saat tilozin serum örneği.

### 3.2.2. Doğrusallık

Tilozin ve tilmikosin stok solüsyonlarından 0,01-100 µg/ml'lik dilüsyonları şeklinde hazırlanan standartların 10 µl'si HPLC sistemine enjekte edildi. Konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrileri ve hesaplanan korelasyon katsayıları (tilmikosin için  $r^2= 0,9992$ , tilozin için  $r^2= 0,9993$ ) (Şekil 3.2)'na dayanılarak metotların 0,01-100 µg/ml aralığında doğrusal olduğu belirlendi.



**Şekil 3.2.** Tilmikosin ve tilozin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart çözeltilerinin (0,01-100 µg/mL) kalibrasyon doğruları ve korelasyon katsayıları.

### 3.2.3. Geri Kazanım

Ana madde içermeyen serumlara tilozin ve tilmikosin standart solüsyonlarının farklı miktarları (20-10 000 ng/ml) ile yükleme yapılarak hesaplanan ortalama geri kazanım değerleri tilozin için % 80±2,47, tilmikosin için % 89.7±5,4 olarak belirlendi.

Ana madde içermeyen sütlere tilozin ve tilmikosin standart solüsyonlarının farklı miktarları (10-10 000 ng/ml) ile yükleme yapılarak hesaplanan ortalama geri kazanım değerleri tilozin için % 80±2,1, tilmikosin için % 87±5,2 olarak hesaplandı.

### 3.2.4. Duyarluluk

**LOD:** S/G oranı 3'den büyük olan en düşük konsantrasyon tilozin serum için 0,050 µg/ml, süt için 0,020 µg/ml; tilmikosin serum için 0,050 µg/ml, süt için 0,020 µg/ml olarak belirlendi.

**LOQ:** S/G oranı 6'dan büyük olan en düşük konsantrasyon tilozin serum için 0,1 µg/ml, süt için 0,025 µg/ml; tilmikosin serum için 0,1 µg/ml, süt için 0,025 µg/ml olarak hesaplandı.

### 3.2.5. Kesinlik

Tilozin ve tilmikosin için zenginleştirilmiş serum ve süt örneklerindeki pik alanlara göre belirlenmiş konsantrasyonlar üzerinden hesaplanan ortalama, standart sapma ve % varyasyon katsayısı değerleri Çizelge 3.2'de gösterildi.



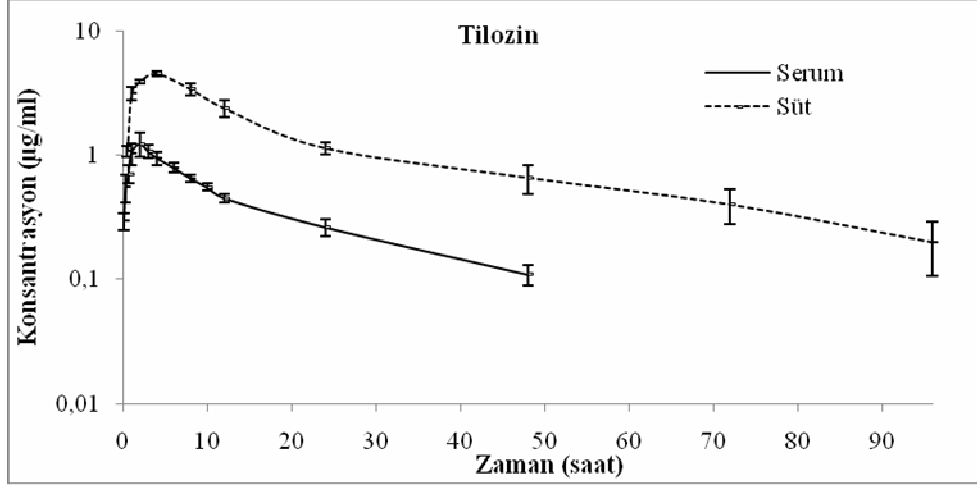
**Çizelge 3.2. Tilmikosin ve tilozinin süt ve serum kesinlik değerleri.**

Yüklenen konsantrasyon (ng/ml)	Tilmikosin Süt			Tilmikosin Serum			Tilozin Süt			Tilozin Serum		
	Ölçülen konsantrasyon (ng/ml, ortalama)	SD	%VK	Ölçülen konsantrasyon (ng/ml, ortalama)	SD	%VK	Ölçülen konsantrasyon (ng/ml, ortalama)	SD	%VK	Ölçülen konsantrasyon (ng/ml, ortalama)	SD	%VK
<u>Gün içi tekrar edilebilirlik</u>												
50	43,16	1,06	2,40	-	-	-	39,83	0,70	1,77	-	-	-
100	91,16	0,70	0,77	88,66	6,37	0,70	84,33	3,93	4,66	80,66	7,07	8,76
500	444,16	7,07	1,59	448,33	6,30	8,88	417,50	35,34	8,46	408,33	14,14	3,46
1000	-	-	-	981	11,31	1,15	-	-	-	815,50	10,60	1,30
<u>Günler arası tekrar edilebilirlik</u>												
50	41,38	1,52	3,69	-	-	-	40,16	0,76	1,90	-	-	-
100	90,38	0,46	0,51	89,66	0,70	0,80	83,66	5,50	6,58	80,21	0,70	0,87
500	440,46	2,61	0,59	460,90	8,88	1,96	416,66	30,55	7,33	408,44	1,18	0,28
1000	-	-	-	980	8,15	0,83	-	-	-	808,5	12,37	1,53

SD; standart sapma, VK; varyasyon katsayısı.

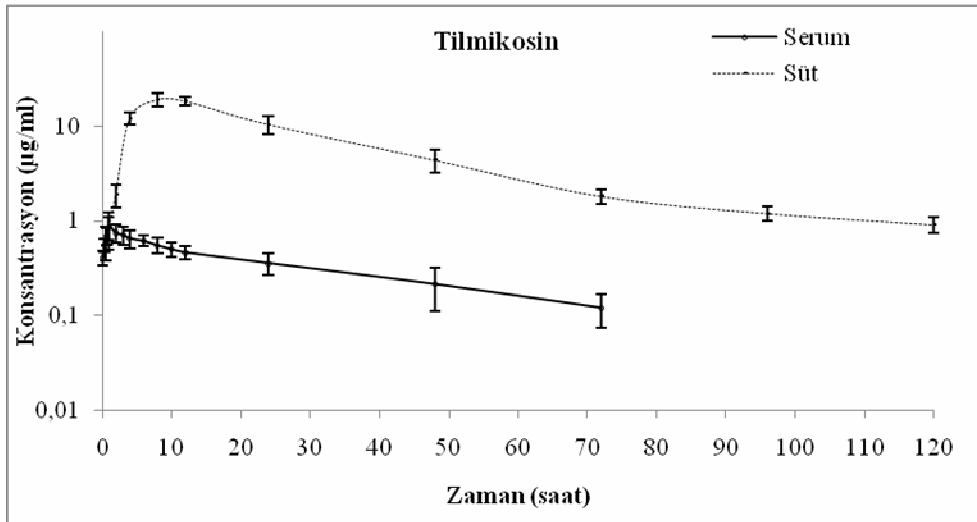
### 3.3. Farmakokinetik Parametreler

Tilozinin kas içi yolla tek doz (17,5 mg/kg) uygulama sonrasında süt ve serum konsantrasyon-zaman eğrileri çizildi (Şekil 3.3). Tilozin için süt ve serumda aynı örnekleme zamanlarındaki (1, 2, 4, 8, 12, 24 ve 48. saatler) konsantrasyonları arasında istatistiksel farklılık ( $P<0,05$ ) olduğu tespit edildi.



Şekil 3.3. Tilozinin tek doz (17,5 mg/kg) kas içi uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik süt ve serum konsantrasyon-zaman eğrileri (n=6).

Tilmikosinin derialtı yolla tek doz (10 mg/kg) uygulama sonrasında süt ve serum konsantrasyon-zaman eğrileri çizildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Tilmikosinin tek doz (10 mg/kg) derialtı uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik süt ve serum konsantrasyon-zaman eğrileri (n=6).

Tilmikosin için süt ve serum konsantrasyonları arasında 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki örnekler arasında istatistiksel anlamda belirgin farklılık ( $P<0,05$ ) olduğu tespit edildi.

Tilozin ve tilmikosinin holştayn ırkı ineklerde iki kompartmanlı dışa açık ve nonkompartmental model analiziyle serum ve sütteki farmakokinetik parametreleri hesaplandı (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3. Hoşltayn ırkı ineklere tek doz tilozin (17,5 mg/kg) Kİ, tilmikosin (10 mg/kg) DA uygulama sonrası bazı farmakokinetik parametreleri.**

PARAMETRE	TİLOZİN		TİLMİKOSİN	
	Ortalama±Standart hata		Ortalama±Standart hata	
	SERUM	SÜT	SERUM	SÜT
$C_{\text{doruk}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,30±0,24	4,55±0,23*	0,86±0,20	20,16±1,13*
$t_{\text{doruk}}$ (saat)	2	4	1	8
EAA ( $\mu\text{g saat/ml}$ )	20,95±1,73	104,29±12,63*	28,42±8,68	639,09±65,33*
$t_{1/2\text{ab}}$ (HO) (saat)	0,54±0,31	-	0,21±0,04	-
$\alpha$ ( $\text{saat}^{-1}$ )	0,26±0,19	-	0,26±0,09	-
$\beta$ ( $\text{saat}^{-1}$ )	0,03±0,003	-	0,02±0,005	-
$t_{1/2\alpha}$ (HO) (saat)	2,63±2,50	-	2,68±1,10	-
$t_{1/2\beta}$ (HO) (saat)	20,46±2,08	26,36±5,55*	29,94±6,65	43,02±5,18*
$Vd_z$ (L/kg)	20±0,9	-	15,56±2,95	-
$K_{01}$ ( $\text{saat}^{-1}$ )	1,28±0,57	-	3,14±0,54	-
$K_{12}$ ( $\text{saat}^{-1}$ )	0,08±0,07	-	0,07±0,04	-
$K_{21}$ ( $\text{saat}^{-1}$ )	0,10±0,05	-	0,18±0,04	-
$C_{\text{doruk-süt}}/C_{\text{doruk-serum}}$	3,61±0,69		20,16±1,13	
$EAA_{\text{süt}}/EAA_{\text{serum}}$	5,01±0,72		23,91±6,38	

\* Aynı satırdaki değerler istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

$C_{\text{doruk}}$ ; serum ve sütteki doruk ilaç yoğunluğu,  $t_{\text{doruk}}$ ; serum ve sütte doruk ilaç yoğunluğa ulaşma süresi, EAA; serum ve süt ilaç yoğunluğu zaman eğrisi altında kalan alan,  $t_{1/2\text{ab}}$ ; emilme yarı ömrü,  $\alpha$ ; serum ilaç yoğunluğu-zaman eğrisinin dağılma dönemi hız sabitesi,  $\beta$ ; serum ilaç yoğunluğu-zaman eğrisinin atılma dönemi hız sabitesi,  $t_{1/2\alpha}$ ; dağılma yarı ömrü,  $t_{1/2\beta}$ ; atılma yarı ömrü,  $Vd_z$ ; dağılım hacmi,  $K_{01}$ ; birinci derece emilme hız sabitesi,  $K_{12}$ ; merkezi bölme ve çevresel bölme arasındaki birinci derece geçiş hızı sabitesi,  $K_{21}$ ; çevresel bölme ve merkezi bölme arasındaki birinci derece geçiş hızı sabitesi, HO; harmonik ortalama.

## 4. TARTIŞMA

### 4.1. Metot

Çalışmada, makrolid grubu antibiyotiklerden tilozin ve tilmikosinin klinik olarak sağlıklı Holştayn ırkı ineklerde farmakokinetiği ve sütteki kalıntı miktarları belirlendi. Ayrıca bu ilaçların süt ve serumda zenginleştirme yolu ile yüksek basınçlı likit kromatografi-UV (HPLC-UV)'de metot validasyonu yapıldı.

Somatik hücre sayısı  $\leq 500\ 000$  olan ve pH 6,5-6,8 (Çizelge 3.1) arasında olan inekler sağlıklı kabul edilerek (Ziv ve Sulman 1973, Resmi Gazete 2006) denek olarak seçildi.

Tilozin ve tilmikosinin serumda tayini, Moran ve ark (1997) ve Garcia-Mayor ve ark (2006) tarafından bildirilen metotlar modifiye edilerek gerçekleştirildi. Belirtilen yöntemin serumda tilmikosin ve tilozin tayini için kullanılabilir olduğu ortaya kondu. Metodun tilozin ve tilmikosin için geri kazanımlarının (sırasıyla %  $80 \pm 2,47$ , %  $89,7 \pm 5,4$ ), tespit (tilozin ve tilmikosin için  $0,050\ \mu\text{g/ml}$ ) ve hesaplanabilir limitlerinin (tilozin ve tilmikosin için  $0,1\ \mu\text{g/ml}$ ) düşük ve tekrar edilebilirliklerinin (her bir madde için  $VK < \%15$ ) olduğu görüldü (Çizelge 3.2). Tüm bu validasyon sonuçları, serum tilozin ve tilmikosin tayininde kullanılan diğer metotlara (Keleş ve ark 2001, Clark ve ark 2004, Womble ve ark 2006) benzerdi.

Tilmikosinin ve tilozinin sütte tayini ise Stobba-Wiley ve Readnour (2000), Dudrikova ve ark (1999) ve Garcia-Mayor ve ark (2006) tarafından bildirilen metotlar modifiye edilerek gerçekleştirildi. Belirtilen yöntemin sütte tilmikosin ve tilozin tayini için kullanılabilir olduğu ortaya kondu. Metodun tilozin ve tilmikosin için geri kazanımlarının (sırasıyla %  $80 \pm 2,1$ , %  $87 \pm 5,2$ ), tespit (tilozin ve tilmikosin için  $0,020\ \mu\text{g/ml}$ ) ve hesaplanabilir limitlerinin (tilozin ve tilmikosin için  $0,025\ \mu\text{g/ml}$ ) düşük ve tekrar edilebilirliklerinin (her bir madde için  $VK < \%15$ ) olduğu görüldü (Çizelge 3.2). Bu sonuçlar, süt tilozin ve tilmikosin tayininde kullanılan diğer metotlardaki (Moast 1985, Helton-Groce ve ark 1993, Parker ve Patel 1994, Ngoh 1996, Dudrikova ve Lehotsky 1998, Saggiorato ve ark 2004) validasyon verileriyle paraleldi.

## 4.2. Serum

Tilozin Kİ uygulamasını takiben serumda 10. dk ile 48. saat arasında, sütte 30. dk ile 96. saat arasında tespit edildi. Bu sonuçlar inekler üzerinde yapılan çalışmaların (Ziv ve Sulman 1973, Gingerich ve ark 1977, Saurit ve ark 2002) sonuçları ile paralellik göstermektedir. Tilmikosin DA uygulamasını takiben serumda 10. dk ile 72. saatler arasında, sütte 30. dk ile 120. saat arasında tespit edildi. Bu sonuçlar inekler (Modric ve ark 1998) ve keçiler (Ramadan 1997) üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları ile benzerlik arz etmektedir.

Tilozin Kİ ve tilmikosin DA uygulamasını takiben her iki ilacın serum konsantrasyon–zaman eğrilerinin iki kompartmanlı dışa açık modele uygunluk gösterdiği belirlendi (Şekil 3.3, Şekil 3.4). Benzer şekilde bazı çalışmalarda (Baggot ve Gingerich 1976, Burrows ve ark 1983, Atef ve ark 1991, Ramadan 1997, Modric ve ark 1998, Taha ve ark 1999, Keleş ve ark 2001) iki kompartmanlı dışa açık model hesaplamalar için kullanılırken, uygunluk analizi (direk bakı ve AIC) yapılmayanlarda (Clark ve ark 2004, Womble ve ark 2006, Abu-Basha ve ark 2007, Kim ve ark 2008) ise non-kompartmental modele rastlanılmaktadır.

Çalışmada tilozinin Kİ uygulamasını takiben serum pik konsantrasyonuna ( $1,30 \pm 0,24$  µg/ml) 2. saatte ulaştığı gözlemlendi (Çizelge 3.3). Sığırlarda yapılan bir çalışmada (Gingerich ve ark 1977) benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Yapılan literatür taramalarında tilozinin serumdaki pik konsantrasyonları inekte 2,5, koyunlarda 2,5- 2,58, keçilerde 2,08- 2,4, mandada 0,47, danada 0,65, buzağılarda 2,2- 4,4, domuzlarda 1,31- 2,71 ve devede 0,62- 1,16 µg/ml; bu konsantrasyonlara ulaşma süresi ise hayvan türüne göre sırasıyla 5, 4-3,29; 3,84-4,19; 0,85; 1,05; 2, 2,36-2,57 ve 0,5-1,5 saat olarak bildirilmiştir (Ziv ve Sulman 1972, 1973, Hjerpe 1979, Atef ve ark 1991, Ziv ve ark 1995a, Saurit ve ark 2002, Kim ve ark 2008). Sonuçlardaki bu çeşitlilik farklı ticari preparatların kullanılması (tilozin baz, tilozin tartarat vs.) ve ilacın kimyasal yapısı, uygulanan doz, uygulama bölgesi, hayvan türü ve ırk gibi ilacın farmakokinetiğini etkileyen faktörlerle açıklanabilir.

Tilozinin serumdaki eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2\beta}$ )  $20,46 \pm 2,08$  saat olarak hesaplandı (Çizelge 3.3). Bu değer domuzda bildirilenden kısa (24 saat) (Prats ve

ark 2002a), diğerk hayvan türlerindekilerden ise (dana 2,24, manda 2,40, deve 2,73- 3,71, domuzda 3,01- 3,88, koyun 6-2,3 ve keçide 5 saat) uzundur (Ziv ve ark 1995a, Taha ve ark 1999, Saurit ve ark 2002, Al-Wabel 2008, Kim ve ark 2008). Değerkler arasındaki bu çeşitlilik hayvan türleri arasındaki anatomik ve fizyolojik farklılıklar ile formülasyon farkına dayandırılmaktadır (Al-Wabel 2008).

İlacın yarı ömrünün uzun oluşu ilacın dokularda birikiminin fazla, atılımının ise yavaş olması ile bağlantılıdır. Eliminasyon yarı ömrünün uzun olması, ilacın enjeksiyon bölgesi ve dokulardaki ilaç rezervuarlarından devamlı salıverilmesi ile ilişkilendirilebilir. Bu durum makrolid atibiyotiklerinin karakteristik özelliğidir (Burrows ve ark 1986). Çalışmada hesaplanan eliminasyon yarı ömrünün uzun olması ineklerde tilozinin penetrasyon düzeyinin yüksek ve dokuda kalma süresi uzun olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar sığır (Gingerich ve ark 1977, Saurit ve ark 2002), keçi (Atef ve ark 1991, Taha ve ark 1999), koyun (Al-Wabel 2008) ve deve (Ziv ve ark 1995a) üzerinde yapılan çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Mevcut çalışmada tilmikosinin DA uygulamasını takiben 1. saatte serum pik konsantrasyonuna ( $0,86\pm0,20$  µg/ml) ulaştığı belirlendi (Çizelge 3.3). Tilmikosinin serumdaki en yüksek konsantrasyonları bulgularımıza benzer olarak koyunlarda 0,822, sığırlarda 0,873, buzağılarda 1,10, keçilerde 1,56 ve tavuklarda 1,28, 2,12 µg/ml; bu konsantrasyonlara ulaşılması için geçen süre hayvan türüne göre sırasıyla 3,9- 0,5- 1- 6,39 ve 4,66- 5,82 saat olarak bildirilmiştir (Morck ve ark 1997, Ramadan 1997, Modric ve ark 1998, Keleş ve ark 2001, Abu-Basha 2007).

Çalışmada elde edilen tilmikosin  $C_{doruk}$  ( $0,86\pm0,20$  µg/ml) ve  $t_{doruk}$  (1. saat) değeri, taylarda ( $0,19\pm0,09$  µg/ml ve  $5,50\pm3,43$  saat, Womble ve ark 2006) ve atlarda ( $0,26\pm0,092$  µg/ml ve  $6\pm9,2$  saat, Clark ve ark 2007) bildirilenlerden daha yüksektir. Atlarda ve taylarda  $C_{doruk}$  değerinin düşük,  $t_{doruk}$  değerin uzun olmasının nedeninin enjeksiyon bölgesinde şekillenen ağırlı şişlik ve ödemle ilgili olabileceği ileri sürülmektedir. Enjeksiyon bölgesindeki reaksiyon tilmikosinin emilimini etkileyebilir ve dokudan düzensiz emilimine neden olabilir (Womble ve ark 2006, Clark ve ark 2007). Bu çalışmada hayvanlarda enjeksiyon bölgesinde belirtilen

olumsuzluklara rastlanılmadığından, daha kısa sürede ve daha yüksek  $C_{\text{doruk}}$  değeri anlamlıdır.

Tilmikosinin serumdaki eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2\beta}$ )  $29,94 \pm 6,65$  saat olarak hesaplandı (Çizelge 3.3) ve bu sonuç çeşitli çalışmalarda bildirilen eliminasyon yarı ömrü sonuçları (sığırlarda 29 saat, keçilerde 29,3 saat, koyunlarda 33 saat, tavuklarda 30,18- 45,0 saat ve tavlarda  $18,4 \pm 10,7$  saat) ile benzerlik göstermektedir (Ramandan 1997, Modric ve ark 1998, Keleş ve ark 2001, Womble ve ark 2006, Abu-Basha 2007). Tavukların diğer hayvan türlerine göre fizyolojik ve morfolojik yönden farklı yapıda olmasına rağmen tilmikosin için farmakokinetik bulguları ruminantlarınkine benzerlik göstermektedir. Bu durum ilacın önemli düzeylerde metabolize edilememesi ve büyük bir kısmının değişmeden atılmasından kaynaklanabilir (Modric ve ark 1998).

Tilozin ve tilmikosinin serum konsantrasyonlarının düşük olması ilaçların zayıf bazik, lipofilik özelliklerinden dolayı geniş ölçüde dokularda birikmeleri ile ilişkilendirilmektedir (Ziv ve ark 1973, Burrows ve ark 1986, Scorneaux ve Shryock 1999, Botsoglou ve Fletouris 2000, Kaya 2000a, Clark ve ark 2004). Bu çalışmada elde edilen dağılım hacimleri (tilozin için  $20 \pm 0,9$  L/kg; tilmikosin için  $15,56 \pm 2,95$  L/kg) de bu durumu destekler niteliktedir (Çizelge 3.3).

#### 4.3.Süt

Tilozin ve tilmikosin uygulamayı takibeden ilk örnekleme zamanında sütte belirlenmiş ve tüm örnekleme zamanlarında sütteki ilaç konsantrasyonları serumdakilerin çok üstünde olduğu tespit edildi ( $P < 0,05$ , Şekil 3.3, Şekil 3.4). Bu sonuçlar tilozin için Gingerich ve ark (1977), Ziv ve Sulman (1973), Atef ve ark (1991) ve Al-Wabel (2008)'in; tilmikosin için Ramadan (1997) sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Her iki ilacın damar dışı uygulama sonrası sütteki yüksek konsantrasyonu noniyonik pasif difüzyonu ile açıklanabilir (Gingerich ve ark 1977).

İlaçların  $EAA_{\text{süt}}/EAA_{\text{serum}}$  ve  $C_{\text{doruk-süt}}/C_{\text{doruk-serum}}$  oranları laktasyondaki ineklerde sistemik uygulama sonrası meme bezine geçişinin göstergeleridir (Al-Wabel 2008).

Tilozin Kİ uygulaması sonrası  $EAA_{süt}/EAA_{serum}$  ve  $C_{doruk-süt}/C_{doruk-serum}$  oranları sırasıyla  $5,01\pm0,72$  ve  $3,61\pm0,69$  olarak hesaplandı. Bu sonuçlar Ziv ve Sulman (1973)'in inek ve koyunlar üzerinde yaptığı çalışma sonuçları ( $EAA_{süt}/EAA_{serum}$  oranı 3,5 ve  $C_{doruk-süt}/C_{doruk-serum}$  oranı 2,5) ile paralellik gösterirken, Al-Wabel (2008)'in bildirdiğinden ( $EAA_{süt}/EAA_{serum}$  oranı 29,5 ve  $C_{doruk-süt}/C_{doruk-serum}$  oranı 11,8) düşük bulunmuştur.

Gingerich ve ark (1977), laktasyondaki ineklerde yaptıkları çalışmada tek doz (12,5 mg/kg) Dİ uygulama sonrası 15 dk içerisinde sütte tilozin belirlediklerini, sütteki konsantrasyonun serumdakini 90. dakikada aştığını ve örnekleme periyodu boyunca 5 katı yükseklikte olduğunu ifade etmektedirler. Dİ enjeksiyonu takiben sütte tilozinin belirlenmesi tilozin noniyonik pasif difüzyonla süte kolaylıkla geçtiğini göstermektedir. Tilozin (pKa 7,1) serumda (pH 7,4) % 67 oranında noniyonizeyken normal sütte (pH 6,5) % 20 oranında noniyonizedir. Denge şartları altında normal sütün pH'sı 6,5 olduğundan süt/serum oranı 4.8/1 olarak bildirilmiştir (Gingerich ve ark 1977).

Ziv ve Sulman (1973) tarafından yapılan çalışmada 20 mg/kg tilozinin Kİ uygulanmasını takiben koyun ve inekdeki farmakokinetik verilerin çok benzer olduğunu ilacın 1-3 saatte maksimum konsantrasyona ulaştığını ve enjeksiyondan sonra 30. dk ise serum-süt konsantrasyonunun dengeye ulaştığını; bir saat sonra ve takibeden örneklemeelerde ise süt seviyesinin daima fazla olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sağlıklı ve mastitisli sütlerde  $C_{doruk-süt}/C_{doruk-serum}$  oranları sırasıyla 2,5 ve 1,6;  $EAA_{süt}/EAA_{serum}$  oranları ise 3,5 ve 2 olarak bildirilmiştir (Ziv ve Sulman 1973).

Tilmikosin DA uygulama sonrası  $EAA_{süt}/EAA_{serum}$  ve  $C_{doruk-süt}/C_{doruk-serum}$  oranları sırasıyla  $23,91\pm6,38$  ve  $20,16\pm1,13$  olarak hesaplandı. Ramadan (1997) ise keçilerde  $EAA_{süt}/EAA_{serum}$  ve  $C_{doruk-süt}/C_{doruk-serum}$  oranlarını sırasıyla  $12,0\pm0,17$  ve  $7,33\pm0,13$  olarak bildirmektedir.

Çalışmada tilozin Kİ uygulamasını takiben sütteki  $C_{doruk}$ ,  $t_{doruk}$  ve  $t_{1/2\beta}$  değerleri sırasıyla  $4,55\pm0,23$  µg/ml, 4. ve  $26,36\pm5,55$  saat olarak tespit edildi (Çizelge 3.3). Tilozinin sütteki en yüksek konsantrasyonları bulgularımıza paralel



olarak inekte 6,22, koyunda 6,68- 7,41 ve keçide 6,9 µg /ml; bu konsantrasyonlara ulaşılması için geçen süre hayvan türüne göre sırasıyla 6, 7-4,5 ve 6. saat olarak bildirilmiştir (Ziv ve Sulman 1973, Atef ve ark 1991, Al-Wabel 2008).

Çalışmada tilmikosinin DA uygulamasını takiben sütteki  $C_{\text{doruk}}$ ,  $t_{\text{doruk}}$  ve  $t_{1/2\beta}$  değerleri sırasıyla  $20,16 \pm 1,13$  µg/ml, 8. ve  $43,02 \pm 5,18$  saat olarak tespit edildi (Çizelge 3.3). Bu bulgular Ramadan (1997)'nin sonuçları ( $C_{\text{doruk}}$  11,6 µg /ml,  $t_{\text{doruk}}$  5,66 saat ve  $t_{1/2\beta}$  41,4 saat ) ile benzerlik göstermektedir. Elde edilen bulgular tilozin ve tilmikosin uygulandıktan kısa bir süre sonra süte yüksek konsantrasyonlarda ulaştığını ve yavaş bir şekilde atıldığını göstermektedir.

İlacın dağılımını etkileyen en belirgin özellik süt ve plazma arasındaki pH'nın ilaç pKa'sı ile olan ilişkisidir (Ziv ve Sulman 1973, Baggot 1980). Tilozin (pKa= 7,1) ve tilmikosin (pKa= 7,4) serumda yüksek oranda noniyonize ve yağda çözünür formda bulunur. Süte (pH= 6,8) pasif difüzyon ile geçerler ve iyonize forma dönüşürler. Böylece genel dolaşıma geri dönemezler. Bu etki iyon tuzağı olarak bilinir ki sütteki tilozinin ve tilmikosinin yüksek konsantrasyonunun nedenidir. Klinik mastitis durumlarında sütün pH'sı 7,5'e ulaşır ve tilozin yüksek oranda noniyonize formda olacaktır. Sonuç olarak ilaç süttten seruma kolaylıkla döner. Bu durumda normal sütle karşılaştırıldığında atılımın uzamasına sebep olmaktadır (Gingerich ve ark 1977, Baggot 1980).

Ziv ve Sulman (1973), tilozinin iyonizasyon derecesinin süt pH'sından etkilendiğini, sütün pH değeri 6,5- 6,8 ve 7,1'de noniyonize ilaç yüzdelерinin sırasıyla % 20, 33 ve 50 olarak hesaplamış, süt pH'sı 7,4'de kana eşit olduğunda ilacın noniyonize formunun %67 olduğunu bildirmiştir. Süt pH'sı düştüğünde süt serum oranı büyümektedir. Bu durum proteine bağlanma oranı ve pH partiyon kavramı ile açıklanmaktadır. Bu sonuç tilozinin süte noniyonik difüzyon ile geçişini ispatlamaktadır. Meme bezi hücrelerine tilmikosinin ulaşmasında hücrenin canlılığı, ısı ve pH etkili iken metabolik inhibitörler veya oksijensizlikten etkilenmediği bildirilmiştir (Scorneaux ve Shryock 1998, 1999).

Makrolid grubu antibiyotikler zamana bağılı etki gösterirler. Etkinliği belirlemede kullanılan temel parametrelerden biri EKEY değerinin üzerinde geçen süredir ( $t > \text{EKEY}$ ). Optimum etkinlik için serum antibiyotik düzeyi doz aralarındaki sürenin en az % 50-60'ında EKEY üzerinde bulunmalıdır. Bu grupta etkinlik konsantrasyondan bağımsız olduğundan dozun yüksekliği değil sıklığı dikkate alınır (Toutain 2002, Mouton ve ark 2005).

Tilozinin duyarlı bakterilerdeki EKEY'ü 0,1-0,5  $\mu\text{g/ml}$  arasında değişir;  $\text{EKEY} \leq 0,7 \mu\text{g/ml}$  olan bakteriler ilaca duyarlı olarak kabul edilir (Kaya 2000a). Çalışmada elde edilen serum ve süt konsantrasyonu birçok duyarlı organizmanın ihtiyacı olan ortalama EKEY değerinden yüksektir. *Streptococcus spp.* (EKEY 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ), *A. pyogenes* (EKEY 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ), *Corynebacterium spp.* (EKEY 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ) için çalışmada serumda EKEY değerine 20. dakikada ( $0,56 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$ ) ulaştığı ve bu değeri 12. saate kadar sürdürdüğü gözlenmektedir. *Pasteurella multocida* ve *Pasteurella haemolytica* (EKEY<sub>90</sub> 13  $\mu\text{g/ml}$ ) gibi bakterilere karşı etkili olmak için ise serum konsantrasyonu çok düşüktür. Sütteki tilozin konsantrasyonu *Streptococcus spp.* (EKEY 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ), *A. pyogenes* (EKEY 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ), *Staph. aureus* (EKEY 0,7  $\mu\text{g/ml}$ ) gibi bakteriler için ihtiyaç duyulan konsantrasyondan oldukça yüksektir (Kirst ve ark 1988, 1989, Debono ve ark 1989, Kaya 2000a).

Çalışmada elde edilen tilmikosin serum konsantrasyonu *A. pyogenes* (EKEY 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ) ve *Mycoplasma bovis* (EKEY 0,25- 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) için ihtiyaç duyulan ortalama EKEY değerinden yüksekken *Strep. agalactia* ve *Cl. perfringens* (EKEY 3,12  $\mu\text{g/ml}$ ), *P. Multocida* ve *P. Haemolytica* (EKEY  $\leq 6,25 \mu\text{g/ml}$ ) için ise düşüktür (Ose 1987, Ziv ve ark 1995b, Nickerson ve ark 1999, Kaya 2000a). Sütteki tilmikosin konsantrasyonu *Staph. aureus* (EKEY 0,78  $\mu\text{g/ml}$ ) için yeterlidir, EKEY konsantrasyonuna 1. saatte ulaşır ve bu düzeyin üzerinde 5. güne kadar kalmaktadır (Ose 1987, Ziv ve ark 1995b, Kaya 2000a).

Tilozin ve tilmikosinin farmakokinetik parametreleri süt ve diğer dokularda ilaçların uzun süreli kalıcılığını işaret etmektedir. Tilozinin tedavi dozunda (10 mg/kg) Kİ uygulanması sonucu yasal olarak sütün tüketilmeme zamanı 8 sağımlık ve MKL 50  $\mu\text{g/kg}$ 'dir (Resmi Gazete 2002, EMEA 2002). Bu çalışmada tilozin

ineklere KI 17,5 mg/kg uygulanmış ve 96. saatte alınan örneklerde ortalama tilozin konsantrasyonu ( $0,20 \pm 0,09$  µg/ml) MKL'nin üzerinde tespit edildi.

Tilozinin sütteki yarı ömrü ( $26,36 \pm 5,55$  saat) de dikkate alındığında belirlenen tüketilmeme süresi yetersiz görülmektedir.

Tilmikosinin laktasyondaki ineklerde kullanımı yasaktır. Ancak tilmikosinin DA uygulamalarını takiben elde edilen sonuçlar ilacın uzun süre memede kalması ve yavaş atılması gibi özelliklerinden dolayı mastitis tedavisinde (Ramadan 1997) etiket dışı kullanımlara neden olmaktadır. EMEA tarafından Avrupa'da da etiket dışı kullanımların sözkonusu olduğu ve bunların kontrollerinin yapılmadığı bildirilmiştir (EMEA 2009). Tilmikosinin tedavi dozunda (10 mg/kg) DA uygulanması sonucu sütteki MKL 50 µg/kg'dir (Resmi Gazete 2002, EMEA 1999). Çalışmada 120. saatte alınan örneklerde ortalama süt tilmikosin konsantrasyonu ( $0,91 \pm 0,07$  µg/ml) MKL'nin çok üzerinde olduğu tespit edildi.

Yarı ömrün yaklaşık 6-7 katı bir süre sonunda vücuttaki ilaç yoğunluğu sağaltıcı etki oluşturacak seviyenin altına indiği ve bu noktadan sonra vücutta bulunan ilaç veya metabolitin esasta kalıntıyı gösterdiği ve yarı ömrün on katı sürede ise ilacın %99.9'unun vücuttan atıldığı kabul edilir (Kaya ve Ünsal 2000). Çalışmada ilaçların serum ve sütteki yarı ömürleri dikkate alındığında ilaçların vücuttan temizlenmesi için tilozin için 8-11 gün, tilmikosin içinse 12-17 güne ihtiyaç duyulacağı görülmektedir. Mastit durumlarında ise bu sürelerin uzaması beklenir.

Bu bulgular doğrultusunda laktasyondaki ineklerde tilozin ve tilmikosin (etiket dışı) kullanımının uzun bir süttten arınma süresi gerektirdiği ve bu nedenle terapötik amaçla kullanımları sırasında kalıntı sorununa yol açabileceği göz önünde tutularak kullanımlarına dikkat edilmesi gerekliliği söylenebilir.

## 5.SONUÇ ve ÖNERİLER

- Çalışmada tilozin ve tilmikosinin serum ve sütte uzun süre sağladıkları konsantrasyonlar birçok duyarlı organizma için ihtiyaç duyulan ortalama t>EKEY değerinden yüksektir.
- Tilozin için elde edilen veriler doğrultusunda laktasyondaki ineklerde kullanımının uzun süttten arınma süresi gerektirdiği ve bu nedenle terapötik amaçla kullanımı sırasında kalıntı sorununa yol açabileceği göz önünde tutularak uygulamanın dikkatli yapılması ve belirlenen sürelerin gözden geçirilmesinin gerekliliği tavsiye edilebilir .
- Tilmikosin için elde edilen veriler doğrultusunda laktasyondaki ineklerde kullanımının bilinenden daha uzun bir süttten arınma süresi gerektirdiği ve bu nedenle etiket dışı kullanımının ciddi kalıntı sorununa yol açabileceğinden laktasyondaki hayvanlarda kullanılmamasının doğruluğu görüldü ve denetlenmesi önerilir.
- Tilozin ve tilmikosin için sütte validasyon parametreleri ile ortaya konmuş metodun (HPLC-UV) ülkemizde yürütülmekte olan Ulusal Kalıntı Kontrol Planı çerçevesinde rutin analizlerde kullanılabilceği ve geliştirilebileceği öne sürülebilir.

## 6. ÖZET

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### Sığırlara Parenteral Yolla Uygulanan Bazı Makrolid Grubu Antibiyotiklerin Sütteki Seviyelerinin Belirlenmesi

Tülay AVCI

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2010

Bu çalışmanın amacı sağlıklı Holştayn ırkı ineklerde tilozin ve tilmikosinin serum ve sütteki farmakokinetiğinin ve bu çerçevede duyarlı ölçüm metotlarıyla sütteki kalıntı miktarlarının yeniden değerlendirilmesidir.

Çalışma 12 adet sağlıklı (3-4 yaş, 350-400 kg) Holştayn ırkı sütçü inek üzerinde gerçekleşti. Hayvanlar rastgele 6'şarlı 2 gruba ayrıldı. Birinci gruba 10 mg/kg dozunda tilmikosin boyun bölgesi dorsolateralinden derialtı yolla, ikinci gruba 17,5 mg/kg dozunda tilozin boyun bölgesi dorsolateralinden kas içi yolla uygulandı. İlaç uygulama öncesi (0) ve takibeden 10, 20 ve 40 dakikalar ile 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde *V. jugularis*'den vakumlu tüplere kan örnekleri (10 ml) toplandı. İlaç uygulama öncesi (0) ve takibeden 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde her örnekleme zamanında meme tamamen boşaltılacak şekilde elle sağılarak steril tüplere süt örnekleri (100 ml) toplandı. Tilozin ve tilmikosinin serum ve süt konsantrasyonları HPLC-UV ile tayin edildi. Her hayvan için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon-zaman grafikleri iki kompartmanlı dışa açık modele uygunluk gösterdi ve tüm farmakokinetik parametreler bu esasa göre hesaplandı.

Tilozin kas içi uygulamasını takiben serum ve sütte sırasıyla doruk konsantrasyonu ( $C_{\text{doruk}}$ )  $1,30 \pm 0,24$  ve  $4,55 \pm 0,23$   $\mu\text{g/ml}$ , doruk konsantrasyona ulaşma zamanı ( $t_{\text{doruk}}$ ) 2. ve 4. saat, eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2\beta}$ )  $20,46 \pm 2,08$  ve  $26,36 \pm 5,55$  saat, eğrinin altında kalan alan (EAA)  $20,95 \pm 1,73$  ve  $104,29 \pm 12,63$   $\mu\text{gsaat/ml}$  bulundu.

Tilmikosin derialtı uygulamasını takiben serum ve sütte sırasıyla doruk konsantrasyonu ( $C_{\text{doruk}}$ )  $0,86 \pm 0,20$  ve  $20,16 \pm 1,13$   $\mu\text{g/ml}$ , doruk konsantrasyona ulaşma zamanı ( $t_{\text{doruk}}$ ) 1. ve 8. saat, eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2\beta}$ )  $29,94 \pm 6,65$  ve  $43,02 \pm 5,18$  saat, eğrinin altında kalan alan (EAA)  $28,42 \pm 8,68$  ve  $639,09 \pm 65,33$   $\mu\text{gsaat/ml}$  bulundu.

Tilozin ve tilmikosinin süte geçiş oranını belirlemede gösterge olan  $EAA_{\text{süt}}/EAA_{\text{serum}}$  ve  $C_{\text{doruk-süt}}/C_{\text{doruk-serum}}$  oranları sarasıyla tilozin için  $5,01 \pm 0,72$  ve  $3,61 \pm 0,69$ , tilmikosin için  $23,91 \pm 6,38$  ve  $20,16 \pm 1,13$  olarak hesaplandı.

Sonuç olarak tilozin ve tilmikosinin tüm örnekleme zamanlarında süt konsantrasyonlarının serum konsantrasyonunu aştığı ve tilozinin sütle atılımının beklenenden daha uzun bir süre aldığı gözlemlendi. Ayrıca kullanılan ölçüm metodunun sütteki kalıntının tespitinde rutin olarak kullanılacak kadar duyarlı ve yeterli olduğu teyit edildi.

**Anahtar Sözcükler:** Süt; İnek; Farmakokinetik; Makrolid; Tilozin; Tilmikosin.

## 7. SUMMARY

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### **Determination of Milk Levels of Some Macrolide-group Antibiotics Following Parenteral Administration to Cows**

**Tülay AVCI**

**Department of Pharmacology and Toxicology**

**PhD THESIS / KONYA-2010**

The aim of the present study is to determine the pharmacokinetics of tylosin and tilmicosin in serum and milk in healthy Holstein breed cows and reevaluate the amount of residue in milk through sensitive measurement methods within this scope.

The study was conducted on 12 healthy (3-4 years old, 350-400 kg) Holstein breed milk cows. The animals were randomly divided into two groups each of which consisted of 6 cows. Tilmicosin was subcutaneously administered to the first group at a dose of 10 mg/kg into the dorsolateral part of the neck region, and tylosin was administered intramuscularly to the second group at a dose of 17,5 mg/kg into the dorsolateral part of the neck region. Blood samples (10 ml) were collected using vacuum tubes from the *V. jugularis* before the administration of the drug (0) and at the following 10, 20 and 40 minutes and 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 and 96 hours. Milk samples were collected in sterile tubes milking the cows by hand and thoroughly emptying the udder at each sampling time before the administration of the drug and at the following 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. Tylosin and tilmicosin serum and milk concentrations were determined through HPLC-UV. The concentration-time graphs that were separately drawn for each animal were found to be consistent with the two-compartment model and all the pharmacokinetic parameters were calculated based on this principle.

Following the intramuscular administration of tylosin, the maximum concentrations ( $C_{max}$ ) in serum and milk were found to be  $1,30 \pm 0,24$  and  $4,55 \pm 0,23$   $\mu\text{g/ml}$ , the time required to reach the peak concentration ( $t_{max}$ ) was found to be 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> hours, elimination half-lives ( $t_{1/2\beta}$ ) were  $20,46 \pm 2,08$  and  $26,36 \pm 5,55$  hours and the area under the curve (AUC) was found to be  $20,95 \pm 1,73$  and  $104,29 \pm 12,63$   $\mu\text{g}\cdot\text{saat/ml}$  respectively.

Following the subcutaneous administration of tilmicosin, the maximum concentrations ( $C_{max}$ ) in serum and milk were found to be  $,86 \pm 0,20$  and  $20,16 \pm 1,13$   $\mu\text{g/ml}$ , the time required to reach the peak concentration ( $t_{peak}$ ) was found to be 1<sup>st</sup> and 8<sup>th</sup> hours, elimination half-lives ( $t_{1/2\beta}$ ) were  $29,94 \pm 6,65$  and  $43,02 \pm 5,18$  hours and the area under the curve (AUC) was found to be  $28,42 \pm 8,68$  and  $639,09 \pm 65,33$   $\mu\text{g}\cdot\text{saat/ml}$  respectively.

$EAA_{milk}/EAA_{serum}$  and  $C_{pmax-milk}/C_{max-serum}$  rates, which are indicators for determining the rate of drugs that pass into milk were respectively calculated as  $5,01 \pm 0,72$  and  $3,61 \pm 0,69$  for tylosin and  $23,91 \pm 6,38$  and  $20,16 \pm 1,13$  for tilmicosin.

In conclusion, it was observed that the milk concentrations exceeded the serum concentrations at all sampling times of tylosin and the excretion of the drugs in milk took longer time than expected. Furthermore, it was confirmed that the measurement method used in the study was sensitive and adequate enough to be routinely used in determining the amount of residue in milk.

**Key Words:** Milk; Cow; Pharmacokinetics; Macrolide; Tylosin; Tilmicosin.

## 8. KAYNAKLAR

1. Aarestrup FM. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96: 271-81.
2. Abu-Basha EA, Idkaidek NM, Al-Shunnaq AF. Pharmacokinetics of tilmicosin (Provitil powder and pulmotil liquid AC) oral formulations in chickens. *Vet Res Commun.* 2007; 31: 477-85.
3. Altekruze SF, Elvinger F, Lee KY, Tollefson LK, Pierson FW, Eifert J, Sriranganathan N. Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* strains from a turkey operation. *J Am Vet Med Assoc.* 2002; 221: 411-16.
4. Al-Wabel NA. The pharmacokinetics and milk residual behaviour of tylosin in lactating Najdi ewes. *Iranian J Vet Res. Shiraz University.* 2008; 9: 138-43.
5. Amsden GW. Advanced-generation macrolides: tissue-directed antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 2001; 18: 11-15.
6. Anderson K, Moats W, Rushing J, Wesen D, Papich M. Ampicilin and amoxicilin residue detection in milk, using microbial receptor assay (Charm II and liquid chromatography methods, after extra label administration of the drug to lactation cows). *Am J Vet Res.* 1996; 57: 73-78.
7. Andrew SM. Effect of fat protein content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residue screening tests. *J Dairy Sci.* 2000; 83: 2992-97.
8. Atef M, Youssef SAH, Atta AH, El-Maaz AA. Disposition of tylosin in goats. *Br Vet J.* 1991; 147: 207-15.
9. Baggot J. Distribution of antimicrobial agents in normal and diseased animals. *J Am Vet Med Assoc.* 1980; 176: 1085-90.
10. Baggot JD, Gingerich DA. Pharmacokinetic interpretation of erythromycin and tylosin activity in serum after intravenous administration of a single dose to cows. *Res Vet Sci.* 1976; 21: 318-23.
11. Beach JC, Murano EA, Acuff GR. Serotyping and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* in feedlot and nonfeedlot beef cattle. *J Food Prot.* 2002; 65: 1694-99.
12. Belloc C, Lam DN, Pellerin JL, Beaudou F, Laval A. Effect of quinolone treatment on selection and persistence of quinolone-resistant *Escherichia coli* in swine faecal flora. *J Appl Microbiol.* 2005; 99: 954-59.
13. Boatto G, Pau A, Palomba M, Arenare L, Cerri R. Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Anal.* 1999; 20: 321-26.
14. Botsoglou NA, Fletouris DJ. *Drug Residues in Food: Pharmacology, Food safety and Analysis* New Drug Residues in Food: Pharmacology, Food safety and Analysis New York, USA: Marcel Dekker Incorporated. 2000; 86-1154.
15. Burrows GE, Barto PB, Martin B, Tripp ML. Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin, and tylosin. *Am J Vet Res.* 1983; 44: 1053-57.
16. Burrows GE, Barto PB, Martin B. Antibiotic disposition in experimental pneumonic pasteurellosis: gentamycin and tylosin. *Am J Vet Res.* 1986; 50: 193-99.
17. Bywater R, McConville M, Phillips I, Shryock T. The susceptibility to growthpromoting antibiotics of *Enterococcus faecium* isolates from pigs and chickens in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 538-43.

18. Cester CC, Ganiere JP, Toutain PL. Effect of stage of oestrous cycle on tylosin disposition in genital tract secretions of cows. *Res Vet Sci.* 1993; 54: 32-39.
19. Chapin A, Rule A, Gibson K, Buckley T, Schwab K. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 137-42.
20. Cinguina AL, Longo F, Anastasi G, Giannetti L, Cozzani R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr A.* 2003; 987: 227-33.
21. Civitareale C, Fiori M, Ballerini A, Brambilla G. Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC–UV/DAD at 1 ppm level. *J Pharm Anal.* 2004; 36: 317–25.
22. Clark C, Woodbury M, Dowling P, Ross S, Boison JO. A preliminary investigation of the disposition of tilmicosin residues in elk tissues and serum. *J Vet Pharmacol Therap.* 2004; 27: 385–87.
23. Clark C, Dowling PM, Ross S, Woodbury M, Boison JO. Pharmacokinetics of tilmicosin in equine tissues and plasma. *J Vet Pharmacol Therap.* 2007; 31: 66-70.
24. Claycamp HG, Hooberman BH. Antimicrobial resistance risk assessment in food safety. *J Food Prot.* 2004; 67 (9): 2063-71.
25. Corcia DA, Nazzari M. Liquid Chromatographic- Mass Spectrometric Methods for Analyzing Antibiotic and Antibacterial Agents in Animal Food Products. *J Chromatogr A.* 2002; 974: 53- 89.
26. De Liguoro M, Anfossi P, Angeletti R, Montesissa C. Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography. *Analyst.* 1998; 123: 1279-82.
27. Debono M, Willard KE, Kirst HA, Wind JA, Crouse GD, Tao EV, Vicenzi JT, Counter FT, Ott JL, Ose EE, Omura S. Synthesis and antimicrobial evaluation of 20-deoxo-20-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl) desmycosin (tilmicosin, EL-870) and related cyclic amino derivatives. *J Antibiot.* 1989; XLII(8):1253-67.
28. Dewdney JM, Maes L, Raynaud JP, Blanc F, Scheid JP, Jackson T, Lens S, Verschueren C. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food-products with regard to their immunoallergic potential. *Food Chem Toxicol.* 1991; 29: 477-83.
29. Diserens J M, Richard M, Beck A. Recovery of penicillin and sulfamethazine from contaminated milk after spray drying. symposium on residue of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. *Internatinal Dairy Federation.* 1995; 149-50.
30. Doyle EM. Veterinary Drug Residues in Processed Meats-Potential Health Risk. A review of the scientific literature [www.wisc.edu/fri/](http://www.wisc.edu/fri/)(Food Research Institute University of Wisconsin-Madison). 2006; 1-11.
31. Draisci R, Palleschi L, Ferretti E, Achene L, Cecilia A. Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2001; 926: 97–104.
32. Dubois M, Fluchard D, Sior E, Delahaut PH. Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J of Chromatogr B.* 2001; 753: 189–202.



33. Dudrikova E, Lehotsky J. A comparison of liquid chromatographic and microtitre test procedures for determining the depletion of tylosin in healthy lactating cows. *Milchwissenschaft*. 1998; 53: 90-92.
34. Dudrikova E, Jozef S, Jozef N. Liquid chromatographic determination of tylosin in mastitic cow's milk following therapy. *J AOAC Int*. 1999; 82: 1303-07.
35. El-Sayed MGA, El-Attar HM, Atef M, Yousif M. Pharmacokinetic profile of tylosin in mastitic cows. *Dtsch Tierärztl Wschr*. 1986; 93: 326-28.
36. EMEA. Tylosin Summary Report (3). Committee For Veterinary Medicinal Products. EMEA/MRL/205/97-FINAL. 1997; <http://www.emea.eu.int> Erişim tarihi: 12.06.2007.
37. EMEA. Tilmicosin Summary Report(3). Committee For Veterinary Medicinal Products. EMEA/MRL/619/99-FINAL. 1999; <http://www.emea.eu.int> Erişim tarihi: 12.06.2007.
38. EMEA. Tylosin Summary Report (5). Committee For Veterinary Medicinal Products. EMEA/MRL/829/02-FINAL. 2002; <http://www.emea.eu.int> Erişim tarihi: 12.06.2007.
39. Englen MD, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR, Dargatz DA. Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* from feedlot cattle. *J Appl Microbiol*. 2005; 99: 285-91.
40. EMEA. Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. *J Vet Pharmacol Therap*. 2009; 32: 515-33.
41. Farnell MB, Donoghue AM, Cole K, Reyes-Herrera I, Blore PJ, Donoghue DJ. *Campylobacter* susceptibility to ciprofloxacin and corresponding fluoroquinolone concentrations within the gastrointestinal tracts of chickens. *J Appl Microbiol*. 2005; 99: 1043-50.
42. Frank GH, Briggs RE, Loan RW, Purdy CW, Zehr ES. Effects of tilmicosin treatment on *Pasteurella haemolytica* organisms in nasal secretion specimens of calves with respiratory tract disease. *Am J Vet Res*. 2000; 61: 525-29.
43. Freedman RA, Anderson KP, Green LS, Mason JW. Effect of erythromycin on ventricular arrhythmias and ventricular repolarization in idiopathic long QT syndrome. *Am J Cardiol*. 1987; 59: 168-69.
44. Garcia-Mayor MA, Garcinuno RM, Fernandez-Hernando P, Durand-Alegria JS. Liquid chromatography–UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. *J Chromatogr A*. 2006; 1122: 76–83.
45. Gaylor DW, Axelrad JA, Brown RP, Cavagnaro JA, Cyr SWH, Hulebak KL, Lorentzen RJ, Miller MA, Mulligan LT, Schwetz BA. Health Risk Assessment Practices in the U.S. Food and Drug Administration. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1997; 26: 307-21.
46. Gingerich DA, Baggot JD, Kowalski JJ. Tylosin antimicrobial activity and pharmacokinetics in cow. *Can Vet J*. 1977; 18: 96-100.
47. Gomis DB, Ferreras AIA, Alvarez MDG, García EA. Determination of Spiramycin and Josamycin in Milk By HPLC and Fluorescence Detection. *J of Food Sci*. 2004; 69: 415-18.
48. Gorham PE, Carroll LH, McAskill JW, Watkins LE, Ose EE, Tonkinson LV, Merrill JK. Tilmicosin as a single injection treatment for respiratory disease of feedlot cattle. *Can Vet J*. 1990; 31:826-29.
49. Grove DC. Prevention of antibiotics in milk–present status. *J Dairy Sci*. 1959; 42: 199-201.

- 50.Güley Z, Akbulut N. Antimikrobiyal Maddeler ve Süt Teknolojisindeki Önemi. 6. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı. 2000; 254-65.
- 51.Harik-Khan R, Moats W. Identification and measurement of betalactamic antibiotic residues in milk: integrations of screening kits whit liquid chromatography. J AOAC Int. 1995; 78: 978-86.
- 52.Hayes JR, English LL, Carr LE, Wagner DD, Joseph SW. Multiple-antibiotic resistance of Enterococcus spp. isolated from commercial poultry production environments. Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 6005-11.
- 53.Helton-Groce SL, Thomson TD, Readnour RS. A study of tilmicosin residues in milk following subcutaneous administration to lactating dairy cows. Can Vet J. 1993; 34: 619-21.
- 54.Hjerpe CA. A comparison of serum antibiotic concentrations achieved in calves with intratracheal administration of procaine penicillin G, ampicillin trihydrate, tylosin, oxytetracycline hydrochloride, chloramphenicol sodium succinate, dihydrostreptomycin sulfate and neomycin sulfate with those achieved with intravenous, intramuscular and subcutaneous administration. Bovine Pract. 1979; 14: 18-26.
- 55.Hwang YH, Lim JH, Park BK, Yun HI. Simultaneous Determination of Various Macrolides by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. J Vet Sci. 2002; 3: 103-08.
- 56.Jiang H, Ding S, Li J, An D, Li C, Shen J. Residue depletion of tilmicosin in cattle after subcutaneous administration. J Agrich Food Chem. 2006; 54: 5208-13.
- 57.Jones GM, Seymour EH. Cowside Antibiotic Residue Testing. J Dairy Sci. 1988; 71: 1691-99.
- 58.Jones GM. On-farm tests for drug residues in milk, milk quality & milking management. Virginia Tech. 1999; 404-10.
- 59.Jordan WH, Byrd RA, Cochrane RL, Hanasono GK, Hoyt JA, Main BW, Meyerholl RD, Sarazan RD. A review of the toxicology of the antibiotic MICOTIL 300. Vet Hum Toxicol. 1993; 35: 151-58.
- 60.Jordan FTW, Horrocks BK. The minimum inhibitory concentration of tilmicosin and tylosin for Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae and a comparison of their efficacy in the control of Mycoplasma gallisepticum infection in broiler chicks. Avian Dis. 1996; 40: 326-34.
- 61.Kanfer I, Skinner MF, Walker RB. Analysis of Macrolide Antibiotics. J Chromatogr A. 1998; 812: 255-86.
- 62.Kaya S. Makrolidler. Ed. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Cilt 2. Baskı 2. Medisan Ankara Türkiye. Bölüm 13. 2000a; 337-43.
- 63.Kaya S. İlaçların Dağılımı. Ed. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Cilt 1. Baskı 2. Medisan Ankara Türkiye. Bölüm 1. 2000b; 67-74.
- 64.Kaya S, Ünsal A. Besinlerde İlaç Kalıntıları. Ed. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Cilt 2. Baskı 2. Medisan Ankara Türkiye. Bölüm 15. 2000; 713-29.
- 65.Kaya S, Bilgili A. Besinlerde Kalıntıları Önemli Bazı İlaçlar. Ed. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Cilt 2. Baskı 2. Medisan Ankara Türkiye. Bölüm 15. 2000; 744-56.
- 66.Kayaalp O. İlaçların Biyolojik Membranlardan Geçiş ve Absorpsiyon Olayı. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 1. Baskı 2. Medisan Ankara Türkiye. Bölüm 15. 1991; 18-22.

- 67.Keleş O, Bakirel T, Şener S, Baktır G, Dağoğlu G, Özkan O. Tavuklarda tilmikosinin farmakokinetiği ve dokulardaki düzeyleri. *Turk J Vet Anim Sci.* 2001; 25: 629-34.
- 68.Kınık Ö, Akbulut N, Karagözlü C. Süt ve süt ürünlerinde kalıntı ve kontaminantlar. *Ege Üniv Ziraat Fak Yayınları.* 2002; 551: 31-42.
- 69.Kim ME, Gebru E, Chang ZQ, Choi JY, Hwang MH, Kang EH, Lim JH, Yun HI, Park SC. Comparative pharmacokinetics of tylosin or florfenicol after a single intramuscular administration at two different doses of tylosin-florfenicol combination in pigs. *J Vet Med Sci.* 2008; 70: 99-102.
- 70.Kirbis A. Microbiological 5-plate screening method for detection of tetracyclines, aminoglycosides, cephalosporins and macrolides in milk. *Slov Vet Res.* 2006; 43: 161-68.
- 71.Kirst HA, Ose EE, Toth JE, Willard KE, Debono M, Felty-Duckworth AM, Pekarek RS. In vitro and in vivo evaluation of C-20 and C-23-modified derivatives of tylosin against veterinary pathogens. *J Antibiot.* 1988; XLI (7): 938-48.
- 72.Kirst HA, Willard KE, Debono M, Toth JE, Truedell BA, Leeds JP, Ott JL, Felty-Duckworth AM, Counter FT. Structure-activity studies of 20-deoxo-20-amino derivatives of tylosin-related macrolides. *J Antibiot.* 1989; XLII (11): 1673-83.
- 73.Lewicki J. Tylosin A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. 2006; [ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/tylosin\\_2006.pdf](http://ftp.fao.org/ag/agn/food/tylosin_2006.pdf) Erişim tarihi: 15.06.2007.
- 74.Lim J, Yun H. Postantibiotic sub-MIC effects of erythromycin, roxithromycin, tilmicosin and tylosin on *Pasteurella multocida*. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;17: 471-76.
- 75.Litterio NJ, Calvinho LF, Flores MM, Tarabla HD, Boggio JC. Microbiological screening test validation for detection of tylosin excretion in milk of cows with low and high somatic cell counts. *J Vet Med A.* 2007; 54: 30-35.
- 76.MacNeil JD. Tilmicosin. [www.fao.org/docrep/W4601E/w4601e0e.htm](http://www.fao.org/docrep/W4601E/w4601e0e.htm).2007; Erişim tarih. 15.06.2007.
- 77.Marsteller T, Winkelman N, Gebhart C, Armbruster G, Weldon W, Muller R, Weatherford J, Symanowski J. Efficacy of intramuscular tylosin for the treatment and control of porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intra cellolaris*. *Vet Therap.* 2001; 2: 51-60.
- 78.Mayra-Makinen A. Technological, significance of residues for the dairy in; Residues of antimicrobial drugs and other inhibitor in milk published by yhe. *Internatinal Dairy Federation.* 1995; 137-38.
- 79.Mccracken RJ, Kennedy DG. The bioavailability of residues of the furazolidone metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in porcine tissues and the effect of cooking upon residue concentrations. *Food Addit Contam.* 1997; 14: 507-14.
- 80.McDougall S, Agnew KE, Cursons R, Hou XX, Compton CRW. Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2006; 90: 779-89.
- 81.Mellenberger RW. Antibiotic violations incerease in Michigan. *Michigan Dairy Rewiew.* 1997, <http://web1.msue.msu.edu/imp/modae/12029202.html> Erişim tarihi 17.06.2008.
- 82.Miller GE, Banerjee NC, Stowe CM. Drug movement between bovine milk and plazma as affected by milk pH. *J Dairy Scie.* 1967; 50: 1395-1403.
- 83.Mitchel J, Mceven S, Mcnab WB, Yee AJ. Antimicrobial drug residues in milk and meat; causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *J Food Protect.* 1998; 61: 742-56.

84. Moast WA. Chromatographic methods for determination of macrolide antibiotic residues in tissues and milk of food-producing animals. *J ASSOC off Anal Chem.* 1985; 68: 980-84.
85. Moast WA, Harris EW, Steele NC. Comparison of Liquid Chromatographic and bioassay procedures for determining depletion of intramuscularly injected tylosin. *J ASSOC Anal Chem.* 1985; 68: 413-16.
86. Modric S, Webb AI, Derendorf H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tilmicosin in sheep and cattle. *J Vet Pharmacol Therap.* 1998; 21: 444-52.
87. Moran JW, Turner JM, Coleman MR. Determination of tilmicosin in bovine and porcine liquid chromatography. *J AOAC Int.* 1997; 80: 1183-89.
88. Morck DW, Merrill JK, Gard MS, Olson ME, Nation PN. Treatment of experimentally induced pneumonic pasteurellosis of young calves with tilmicosin. *Can J Vet Res.* 1997; 61: 187-92.
89. Mounton JW, Dudley MN, Derendorf H ve Drusano GL. Standardization of pharmacokinetic /pharmacodynamic terminology for anti-infective drugs: an update. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55: 601-07.
90. Naccari F, Giofre F, Pellegrino M, Calo M, Licata P, Carli S. Effectiveness and kinetic behaviour of tilmicosin in the treatment of respiratory infections in sheep. *Vet Rec.* 2001; 148: 773-76.
91. Ngoh MA. Determination of tilmicosin in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection. *J AOAC Int.* 1996; 79: 652-55.
92. Nickerson SC, Owens WE, Fox LK, Scheifinger CC, Shryock TR, Spike TE. Comparison of tilmicosin and cephalixin as therapeutics for *Staphylococcus aureus* mastitis at dry-off. *J Dairy Sci.* 1999; 82: 696-703.
93. O'keeffe M, Kennedy O. Residues- A food safety problem? *J of Food Safety.* 1998; 18: 297-319.
94. Ose EE. In vitro antibacterial properties EL-870, a new semisynthetic macrolide antibiotic. *J Antibiot.* 1987; 40: 190-94.
95. Önal A, Aydın N, Ayaz Y, Scan D, Savaş N. Süt ve etlerde bulunan Bazı antibiyotiklerin çeşitli yöntemlerle saptanması. *Etlik Vet Mikrobiyol Enst Derg.* 1993; 7: 34-51.
96. Parker RM, Patel RKP. Determination of Tilmicosin in Ovine Milk Using High Performans Liquid Chromatography. *Analyst.* 1994; 119: 2577-79
97. Periti P, Mazzei T, Mini E, Novelli A. Adverse effects of macrolide antibacterials. *Drug Saf.* 1993; 9: 346-64.
98. Prats C, Francesch R, Arboix M, Perez B. Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 2001; 766: 57-5.
99. Prats C, El Korchi G, Francesch R, Arboix M, Perez B. Disposition kinetics of tylosin administered intravenously and intramuscularly to pigs. *Res Vet Sci.* 2002a; 73: 141-44.
100. Prats C, El Korchi G, Francesch R, Arboix M, Perez B. Tylosin depletion from edible pig tissues. *Res Vet Sci.* 2002b; 73: 323-25.
101. Ramadan A. Pharmacokinetics of tilmicosin in serum and milk of goats. *Res Vet Sci.* 1997; 62: 48-50.
102. Ramirez A, Gutierrez R, Diaz G, Gonzalez C, Perez N, Vega S, Noa M. High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk. *J Chromatogr B.* 2003; 784: 315-22.

103. Resmi Gazete. 24739 sayılı "Türk Gıda Kodeksi-Hayvasal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği (2002/30)". 28.04.2002. [www.rega.basbakanlik.gov.tr](http://www.rega.basbakanlik.gov.tr).
104. Resmi Gazete. 25705 sayılı "Canlı Hayvanlar ve hayvansal ürünlerde belirli maddeler ile bunların kalıntılarının izlenmesi için alınacak önlemlere dair yönetmelik". 19.01.2005. [www.rega.basbakanlik.gov.tr](http://www.rega.basbakanlik.gov.tr).
105. Resmi Gazete. 26267 sayılı "TGK Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği (2006/38)". 22.08.2006 [www.rega.basbakanlik.gov.tr](http://www.rega.basbakanlik.gov.tr).
106. Retsema J, Wenchi Fu. Macrolides: structures and microbial targets. *Int J Antimicrob Agents*. 2001; 18: 3-10.
107. Riediker S, Rytz A, Stadler RH. Cold- temperature stability of five d-laktam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A*. 2004; 1054: 359-63.
108. Roets E, Beirinckx P, Quintens I, Hoogmartens J. Quantitative analysis of tylosin by column liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1993; 630: 159-66.
109. Rose MD, Shearer G, Farrington WHH. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 1. clenbuterol. *Food Addit Contam*. 1995a; 12: 67-76.
110. Rose MD, Argent LC, Shearer G, Farrington WHH. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 2. levamisole. *Food Addit Contam*. 1995b; 12: 185-94.
111. Rose MD, Farrington WHH, Shearer G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 3. sulphamethazine (sulphadimidine). *Food Addit Contam*. 1995c; 12: 739-50.
112. Rose MD, Bygrave J, Farrington WHH, Shearer G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 4. oxytetracycline. *Food Addit Contam*. 1996; 13: 275-86.
113. Rose MD, Shearer G, Farrington WHH. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 5. oxfendmlle. *Food Addit Contam*. 1997; 14: 15-26.
114. Saggiorato M, Pradella G, Fedrizzi G, Menotta S, Scandurra S, Anfossi P, Casarotti M, Giovanardi D. Excretion of tilmicosin in milk of rabbits after subcutaneous administration. *Proceeding of the 8th congress of the world rabbits science association*. 2004: 620-25.
115. Samanidou V, Nisyriou S. Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk. *J Sep Sci*. 2008; 31: 2068-90.
116. Saurit AR, Rubio M, Baroni E, San Andres M, Sanchez S, Boggio JC. Some comparative aspects of the pharmacokinetics of tylosin in buffaloes and cattle. *Vet Res Commun*. 2002; 26: 49-54.
117. Schenck FJ, Callery PS. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J Chromatogr A*, 1998; 812: 99-109.
118. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents*. 2001; 17: 431-37.
119. Scoreaux B, Shryock TR. Intracellular accumulation, subcellular distribution and efflux of tilmicosin in chicken phagocytes. *Poultry Sci*. 1998; 77: 1510-21.
120. Scoreaux B, Shryock TR. Intracellular accumulation, subcellular distribution and efflux of tilmicosin in bovine mammary, blood and lung cells. *J Dairy Sci*. 1999; 82: 1202-12.
121. Serratosa J, Blass A, Rigau B, Mongrell B, Rigau T, Tortades M, Tolosa E, Aguilar C, Ribo O. Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in

- food-producing animals: a European Union Perspective. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2006; 25: 637-53.
122. Shaikh B, Moats WA. Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. *J Chromatogr.* 1993; 643: 369-78.
123. SPSS 15.0. SPSS for Windows Evaluation Version, SPSS Inc., LEAD Tech., USA.
124. Stead DA. Current methodologies for the analyses of aminoglycosides. *J Chromatogr B.* 2000; 747: 69-93.
125. Stobba-Wiley CM, Chang JP, Elsbury DT, Moran JW, Turner JM, Readnour RS. Determination of tilmicosin residues in chicken, cattle, swine and sheep tissues by liquid chromatography. *J AOAC Int.* 2000; 83: 837-46.
126. Stobba-Wiley CM, Readnour RS. Determination of tilmicosin residues in cow and sheep milk by liquid chromatography. *J AOAC Int.* 2000; 83: 555-62.
127. Şenyuva HZ, Gilbert J. Metod geliştirme ve validasyonu için basit kullanım kılavuzu. Hacettepe Üniversitesi Hastaneler Basımevi. Ankara. 2006.
128. Taha AA, Elsheikh HA, Khalafalla AE, Osman IAM, Salam Abdullah A. Disposition kinetics of tylosin administered intravenously and intramuscularly in desert sheep and Nubian goats. *Vet J.* 1999; 158: 210-15.
129. Tamargo J, De Miguel B, Tejerina MT. A comparison of josamycin with macrolides and related antibiotics on isolated rat atria. *Eur J Pharmacol.* 1982; 80: 285-93.
130. Toldra F, Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Food Sci Technol Res.* 2006; 17: 482-89.
131. Toutain PL. Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration in drug development and dosage-regimen optimization for veterinary medicine. *AAPS Pharm Sci.* 2002; 4: 1-29.
132. Usp. Macrolides. The United States Pharmacopeial Convention 2007. [www.usp.org/pdf/macrolides](http://www.usp.org/pdf/macrolides). Erişim tarihi: 20.02.2008.
133. Uysal H, Kınık Ö, Gönç S. Yoğurda işlenecek sütün özellikleri ve antibiyotiklerin yoğurt teknolojisine ve kalitesine etkileri. 3. Milli Süt Ürünleri Sempozyumu Kitabı. Milli Produktivite Merkezi Yayınları. Ankara. 1995; 548: 26-37.
134. Üney K. Bazı koyun ırklarında kafeinin farmakokinetiği ve metabolizmasının karşılaştırılması. Selçuk Üniversitesi. Doktora Tezi. 2008; 35-37.
135. Van Donkersgoed J, Dubeski PL, Vanderkog M, Aalhus JL, Bygrove S, Starr WN. The effect of animal health products on the formation of injection site lesions in subprimals of experimentally injected beef calves. *Can Vet J.* 2000; 41: 617-22.
136. Wakabayashi K, Yamada S. Effects of several macrolide antibiotics on blood pressure of dogs. *Jpn J Pharmacol.* 1972; 22: 799-807.
137. Wallgren P, Segall TA, Pedersen M, Gunnarson A. Experimental infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs II. Comparison of antibiotics for oral strategic treatment. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1999; 46: 261-9.
138. Wang J, Leung D, Lenz SP. Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 2873-80.

- 139.WHO. The medical impact of the use of antimicrobials food animals. Berlin, Germany.1997;  
[http://worldpubliclibrary.org/Members.3/World\\_Health\\_Collection](http://worldpubliclibrary.org/Members.3/World_Health_Collection) Erişim tarihi 10.05.2008.
- 140.WHO. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Technical Report Series 954.  
2008:103-16.
- 141.WinNonlin® Professional Version 4.1, Pharsight Corporation, Scientific Consulting Inc., North  
Carolina, USA.
- 142.Womble A, Giguere S, Murthy YVSN, Cox C, Obare E. Pulmonary disposition of tilmicosin in  
foals and in vitro activity against rhodococcus equi and other common equine bacterial  
pathogens. J Vet Pharmacol Therap. 2006; 29: 561–68.
- 143.Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of akaike's information criterion in evaluation of  
linear pharmacokinetic equations. J Pharmacokinet Biopharm. 1978; 6: 165–75.
- 144.Yaygın H. Yoğurt teknolojisi. Akdeniz Üniversitesi Basımevi. Antalya.1999; 28-31.
- 145.Zeleny R, Ulberth F, Gowik P, Polzer J, van Ginkel LA, Emons H. Developing new reference  
materials for effective veterinary drug-residue testing in food-producing animals. Trends  
Analyt Chem. 2006; 25: 927-36.
- 146.Ziv G, Sulman FG. Binding of antibiotics to Bovine and Ovine serum. Antimicrob Agents  
Chemother. 1972; 2(3): 206-213.
- 147.Ziv G, Sulman FG. Serum and milk concentrations of spectinomycin and tylosin in cows and  
ewes. Am J Vet Res. 1973; 34: 329-33.
- 148.Ziv G, Bogin E, Shani (Mishkinsky) J, Sulman FG. Distribution and blood-to-milk transfer of  
labeled antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1973; 3: 607-13.
- 149.Ziv G, Sulman FG. Absorption of antibiotics by the bovine udder. J Dairy Sci. 1974; 58: 1637-  
44.
- 150.Ziv G, Creveld CV, Ben-Zvi Z, Glickman A, Yagil R. Disposition kinetics of tylosin tartrate  
administered intravenously and intramuscularly to normal and water-deprived camels. J Vet  
Pharmacol Ther. 1995a; 18: 299-305.
- 151.Ziv G, Shem-Tov M, Glickman A, Winkler M, Saran A. Tilmicosin antibacterial activity and  
pharmacokinetics in cows. J Vet Pharmacol Ther. 1995b; 18: 340-45.





## 10. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Çankırı'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1996 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdi. Bir yıl İngilizce hazırlık eğitimi aldı. 2002 yılında mezun oldu. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Farmakoloji ve Toksikoloji A.B.D.'de doktora eğitimine başladı. Aynı yıl açıktan atama ile Mardin İl Tarım Müdürlüğü Kontrol Şube Müdürlüğü'nde Veteriner Hekim olarak göreve başladı. 2007 yılında Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne tayin oldu. Halen Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarı'nda Veteriner Hekim olarak görev yapmaktadır. 2005 yılında meslektaşı Oğuzhan AVCI ile evlendi.