



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HIJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANA BİLİM DALI**

**BURSA'DA TÜKETİME SUNULAN
TAVUK GÖĞÜS ETİ, BUT ETİ VE KARACİĞERİNDE
BAZI ANTİBİYOTİK KALINTILARININ ARAŞTIRILMASI**

Artun YIBAR

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2011



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANA BİLİM DALI

BURSA'DA TÜKETİME SUNULAN
TAVUK GÖĞÜS ETİ, BUT ETİ VE KARACİĞERİNDE
BAZI ANTİBİYOTİK KALINTILARININ ARAŞTIRILMASI

Artun YIBAR

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Gül Ece SOYUTEMİZ

Bursa-2011

Bu tez, Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından V(U)-2009/20 numaralı proje ile desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	III
İNGİLİZCE ÖZET	IV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	6
Beslenme ve Üretim Arasındaki İlişki	6
Kanatlı Eti, Üretimi ve Tüketimi	6
Tavuk Eti ve Yapısı	9
Tavuk Etinin Besin Değeri ve Beslenmedeki Önemi	10
Veteriner Hekimliğinde İlaç Kullanımı	11
Etki Mekanizmaları	11
Kullanım Yoğunluğu	12
Kalıntılar ve Oluşumları	14
İlaç Kalıntılarının Sebepleri	15
İlaç Kalıntılarının Olumsuz Etkileri	16
Tüketici Gözüyle Kalıntılar ve Gıda Güvenliği	20
Ülkemiz Tavuk Yetiştiriciliğinde Yaygın Olarak Kullanılan Antibiyotikler	21
Kloramfenikol	22
Enrofloksasin/Siprofloksasin	26
Nitrofuran AOZ	31
Antibiyotik Kalıntı Analiz Teknikleri	33
Nicel Yöntemlerin Kesinliği	36
Kalibrasyon Eğrileri	38
Karar Limti (CC α)	38
Saptama Yeteneği (CC β)	39
Gıdalara Uygulanan Bazı İşlemlerin Antibiyotik Kalıntıları Üzerine Etkileri	40
İlaç Kalıntılarının İzlenmesi, Önlenmesi ve Risklerinin Ortadan Kaldırılması	41
Kalıntılara İlişkin Yasal Düzenlemeler ve Uygulanan Sistemler	45
Türkiye’de Mevcut Risk Durumu	47
GEREÇ ve YÖNTEM	50
Gereç	50
Tavuk Eti ve Karaciğeri Örnekleri	50
Kimyasallar ve Çözeltiler	50
ELISA Analizi	50
Enrofloksasin/Siprofloksasin	50
Kloramfenikol	51
Nitrofuran, Furazolidon AOZ	51
LC-MS/MS Analizi	52
Kloramfenikol	52
Nitrofuran	52
Alet/Donatı	52
ELISA Analizi	52
LC-MS/MS Analizi	53
Yöntem	54
ELISA ile Tavuk Etinde Enrofloksasin/siprofloksasin Kalıntısı Tespiti	54

Örnek Hazırlama	54
ELISA Analizi İçin Yıkama Çözeltisinin Hazırlanması	54
ELISA Analizi	55
ELISA ile Tavuk Etinde Kloramfenikol Kalıntısı Tespiti	55
Örnek Hazırlama	55
ELISA Analizi İçin Yıkama Çözeltisinin Hazırlanması	56
ELISA Analizi İçin Enzim Konjugat Hazırlanması	56
ELISA Analizi	56
ELISA ile Tavuk Karaciğerinde Nitrofuran AOZ Kalıntısı Tespiti	57
Örnek Hazırlama	57
ELISA Analizi İçin Yıkama Çözeltisinin Hazırlanması	58
ELISA Analizi	58
ELISA Yükleme İçin Dış Standart Katılması	58
Enrofloksasin/Siprofloksasin	58
Kloramfenikol	59
Nitrofuran AOZ	59
LC-MS/MS ile Tavuk Etinde Kloramfenikol Kalıntısı Tespiti	59
Standart Solüsyonların (Dış Yükleme ve İç) Hazırlanması	60
Örnek Ekstraksiyonu	61
Matriks Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	61
Mobil Faz Hazırlanması	61
LC-MS/MS Analizi	62
MS/MS Şartları	62
Otomatik Örnekleyici Parametreleri	63
LC Pompa Parametreleri	64
Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplama	65
LC-MS/MS ile Tavuk Karaciğerinde Nitrofuran Kalıntısı Tespiti	66
Standart Solüsyonların (Dış Yükleme ve İç) Hazırlanması	67
Örnek Ekstraksiyonu	68
Matriks Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	68
Mobil Faz Hazırlanması	69
LC-MS/MS Analizi	69
MS/MS Şartları	69
Otomatik Örnekleyici Parametreleri	70
LC Pompa Parametreleri	70
Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplama	71
BULGULAR	72
ELISA Analizi	72
LC-MS/MS Analizi	80
TARTIŞMA ve SONUÇ	89
EKLER	99
KAYNAKLAR	131
TEŞEKKÜR	144
ÖZGEÇMİŞ	145

ÖZET

Bu çalışma, Aralık 2008 - Ağustos 2009 tarihleri arasında Bursa'da satışa sunulan tavuk göğüs eti ve but etlerinde kloramfenikol ve enrofloksasin/siprofloksasin kalıntıları ile tavuk karaciğerinde nitrofuran AOZ kalıntılarının varlığını araştırmak amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla 90 but ve 90 göğüs eti olmak üzere toplam 180 tavuk eti ve 90 adet karaciğer örneği materyal olarak kullanıldı. Antibiyotik kalıntılarının araştırılmasında ELISA tekniğinden, kalıntı varlığının doğrulanması için ise LC-MS/MS tekniğinden yararlanıldı. ELISA analizleri sonucunda, 10 adet (% 11.1) but eti ve 5 adet (% 5.5) göğüs etinin tespit edilebilir limitlerin üzerinde kloramfenikol kalıntısı içerdiği belirlendi. Aynı örneklerde enrofloksasin/ siprofloksasin kalıntı düzeyi, but etlerinin 4 adeti (% 4.4) ve göğüs etlerinin de 8 adetinde (% 8.9) tespit edilebilir limitlerin üzerinde bulundu. Karaciğer örneklerinin 11 adeti (% 12.2) nitrofuran AOZ kalıntıları için pozitif sonuç verdi.

On beş adet ELISA pozitif ve 45 adet ELISA negatif örnek, kloramfenikol bakımından LC-MS/MS ile doğrulamaya maruz bırakıldı. Pozitif örneklerden 2'si ile negatif örneklerden 1'inin LC-MS/MS ile bu antibiyotiğin kalıntılarını içerdiği (150-361 ng/kg) tespit edildi. 1 adet ELISA pozitif ve 8 adet ELISA negatif örnek de, nitrofuran AOZ bakımından LC-MS/MS ile doğrulamaya maruz bırakıldı. Bu örneklerden yalnızca ELISA pozitif 1 örneğin LC-MS/MS ile bu antibiyotiğin kalıntılarını içerdiği (1291 ng/kg) tespit edildi.

ELISA ile enrofloksasin/siprofloksasin kalıntılarını içeren örneklerde, söz konusu antibiyotiklere ilişkin kalıntı düzeyleri (10.59-49.18 µg/kg), Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde izin verilen maksimum kalıntı limitleri (MKL, 100 µg/kg) değerleri içerisindeydi.

Antibiyotik kalıntılarının neden olduğu sağlık riskleri göz önüne alındığında (insanlarda toksik, karsinojenik ve alerjik etkiler ile mikroorganizmalarda direnç gelişimi), önemli bir protein kaynağı olan kanatlı hayvan eti ve ürünlerinde kalıntılarının tespitine yönelik araştırmaların gerçekleştirilmesi gerektiği çok açıktır. Bu nedenle söz konusu çalışmadan elde edilen sonuçların, ülkemiz halk sağlığını koruma çalışmalarına ve gıda kontrol hizmetlerine ışık tutacak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik, kalıntı, tavuk eti, tavuk karaciğeri, ELISA, LC-MS/MS

SUMMARY

Investigation of some antibiotic residues in chicken breast, drums and liver sold in Bursa

The present thesis was undertaken to investigate the presence of residual “chloramphenicol” and “enrofloxacin/ciprofloxacin” antibiotics in chicken breast and drums parts as well “nitrofurantoin AOZ” residue in chicken liver in samples collected between 2008 December-2009 August in Bursa Province. For this aim, ELISA and confirmatory LC-MS/MS techniques were employed for the analysis of 180 chicken meat parts (composed from 90 drums and 90 breasts) and 90 liver samples. 10 of drumsticks (11.1 %) and 5 of breast (5.5 %) samples were found to contain chloramphenicol residue at the detectable limits. Likewise, 4 drum meats (4.4 %) and 8 breast meats (8.9 %) were found to contain enrofloxacin/ciprofloxacin residue at the detectable levels. 11 of liver samples (12.2 %) gave positive result for nitrofurantoin AOZ residues by ELISA.

Verification of 15 and 45 samples giving positive and negative results respectively by ELISA in terms of chloramphenicol were performed by LC-MS/MS. Three meat samples (2 positives and 1 negative) were found to contain chloramphenicol residue in the level varying between 150-361 ng/kg. Confirmatory analysis were similarly performed for nitrofurantoin AOZ residue (1 positive and 8 negatives) and only the positive sample was found to contain the antibiotic at the 1291 ng/kg level.

The level for enrofloxacin/ciprofloxacin residue (10.59-49.18 µg/kg) were within maximum residue limits (MRL, 100 µg/kg) permitted in Turkish Food Codex Regulation, by ELISA.

Given the health risks caused by antibiotic residues (toxic, carcinogenic and allergic effects in humans and the development of the resistance in micro-organisms), it is very clear that researches towards detecting residues in the chicken meats and products as being important protein source should be realized. So it is considered that results obtained from the present study would provide evidence on public health and food control services.

Anahtar kelimeler: Antibiotics, residue, chicken meat, chicken liver, ELISA, LC-MS/MS

GİRİŞ

Günümüzde yeterli ve dengeli beslenme kavramı halk sağlığını yakından ilgilendiren, toplumun sosyal ve ekonomik gelişmesinde önemli rol oynayan bir gerçektir (1). Dengeli beslenmede besin unsurlarından en önemlisini proteinler teşkil eder. İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen eksojen aminoasitleri yeterli ve dengeli bir biçimde içermesi bakımından da hayvansal kaynaklı gıda maddeleri, insan beslenmesinde zorunlu ve vazgeçilmez protein kaynaklarındandır (1, 2). Pişirilmiş ve yemeye hazır bir tavuk eti de % 25-35 oranlarında ihtiva ettiği protein miktarı ile protein kaynaklarının en önemli öğelerindendir (3).

Dünya kanatlı eti üretiminin yaklaşık % 90'ını tavuk eti oluşturmaktadır. Tavuk etleri yüksek besleyici değere sahip, ekonomik ve kolay hazırlanabilir bir gıda maddesi olması ile birlikte, tüketimine ilişkin dini bir kısıtlama olmamasından dolayı da tüm dünyada fazlasıyla talep görmektedir (4). Ülkemizdeki resmi kayıtlar da göstermektedir ki, Türkiye beyaz et üretimi 2008'den 2009'un sonlarına gelindiğinde % 17.9 artarak 1.323.624 tona ulaşmıştır. Bu miktarın % 96.48'i broiler (et tavuğu), % 1.23'ü yumurta tavuğu, % 2.28'i hindi eti ve % 0.01'i ise ördek etinden oluşmaktadır (5).

Ülkemizde kesimi yapılmakta olan broiler piliçler, çoğunlukla entansif üretim şekli ile yetiştirilmektedir. Veteriner ilaçları da, bu entansif üretimin en gerekli ve etkili unsurlarındandır. Nitekim, halen gıda üretiminde kullanılan bu hayvanların yaklaşık % 80'ine, yaşamlarının belli bir kısmında veya birçok zamanında ilaçla tedavi uygulanmaktadır (6).

Veteriner ilaçları ile beraber hastalıkları önlemek ve kontrol etmek için ilk olarak 1950'lerde yem katkısı olarak kullanılmaya başlayan antibiyotikler, ayrıca çevresel değişimlerin, aşılanmanın, gaga kesimlerinin ve diğer kümes yönetim uygulamalarının yol açtığı stres etkilerini ortadan kaldırmak ve büyümeyi arttırmak için de yemlere ve içme sularına katılmaktadır (7-14). Birçok antibiyotik, yukarıda anlatılan kullanım amaçlarından dolayı, düzenli şekillerde tedavi edici dozlarının altında kullanılarak, hayvanların yemden yararlanma kabiliyetlerini arttırmakta, entansif üretimdeki fire miktarlarını ve yağ oranlarını da azaltmaktadır (15-19).

Avrupa Birliği'ne üye ÷lkelerde 1996 yılında 10.200 ton antibiyotik kullanılmış ve bunun yaklaşık yarısını veteriner hekimlik alanındakiler oluşturmuştur. Avrupa Hayvan Sağlığı Federasyonu (European Federation of Animal Health, FEDESA) tarafından, 1999 yılında Avrupa Birliği içinde 13.288 ton antibiyotik kullanıldığı, bunun % 65'inin insan tedavisinde, % 29'unun veteriner hekimlik alanında tedavi maksatlı, % 6'sının da büyüme arttırıcı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (7).

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), 2000 yılında 16.200 ton antibiyotik üretilmiş ve bunun % 70'i veteriner hekimliği alanında kullanılmıştır. Bu verilere bakılarak, 2000 yılı içindeki dünya antibiyotik pazarının yaklaşık 100.000 ile 200.000 ton arasında gerçekleştiği tahmin edilmektedir (20).

2004 yılında Avrupa Birliği içerisinde; 4.6 ton hormon, 194 ton antiparazitik, 221 ton metabolizma düzenleyici ve 5.393 tonla en geniş orana sahip antibiyotiklerden oluşan toplamda 6.051 tonluk veteriner ilaçları aktif maddesi kullanılmıştır (21).

Türkiye'de ise 2006 verilerine göre, veteriner hekimliğinde ana ilaç grupları bakımından toplam tüketimin % 77'sini, bakteriyel (% 33) ve paraziter hastalıklarla mücadelede kullanılan ilaçlar (% 28) ile hayvansal verimin arttırılmasını destekleyici ürünler (% 16) oluşurmaktadır (22). Son 15 yılda yapılan bu çalışmalara ve istatistiklere bakıldığında, ilaç üretim ve kullanımının ne boyutlarda olduğunu daha rahat görebilmekteyiz.

Veteriner hekimlikte profilaksi, gelişmeyi arttırma veya yem kalitesini yükseltme amacı ile uzun periyotlar halinde, düşük konsantrasyonlarda verilen bu kadar çok antibiyotiğin, tamamen metabolize olmaması veya vücuttan tamamen atılmamasına bağlı olarak, kasaplık hayvanların etleri, iç organları ile yumurta ve sütlerinde antibiyotik kalıntıları bulunabilmektedir. Bu kalıntıları içeren gıdaları tüketen insanlarda toksik ve alerjik etkilerin yanı sıra birçok mikroorganizmada da direnç gelişimi meydana gelmektedir (23).

Ayrıca, hem insan hem de hayvan sağlığında kullanılan farmasötik etkili bu maddeler, sadece gıdalarımızda değil gıdalar dışında toprakta ve suda da tespit edilebilmektedirler (21, 24). İlaç uygulanan hayvanların idrar ve dışkılarında önemli düzeyde ana bileşikler ve onların metabolitleri bulunabilmektedir. Özellikle dışkının tarım arazilerinde gübre olarak

kullanılması sonucu, bu alanlarda antibakteriyel ilaç kirliliği oluşmakta, dolayısıyla halk sağlığını ciddi şekilde etkileyebilecek bir durum gelişebilmektedir (25).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), gıda üretiminde teknoloji kullanımının yoğunlaştığı, kitlesel yaygınlık kazandığı ve gıda üretim zincirinin karmaşık hale geldiği bir ortamda “kabul edilemeyen bir düzeyde bulunduğu sağlık üzerinde olumsuz etkisi bulunan biyolojik, kimyasal veya fiziksel ajan” tanımlamalarını gıdaların tüketiciler üzerinde oluşturabileceği “tehlike” olarak ifade etmektedir. DSÖ’nün bu tanımında da, gıda zinciri içine herhangi bir şekilde dahil olmuş veteriner ilaçları, insan sağlığını tehdit edebilecek önemli kimyasal tehlikelerden biri olarak sayılmaktadır (26).

Gıda güvenliği gıdanın tarladan sofraya kadar tüm gıda zinciri boyunca mikrobiyolojik, kimyasal ve fiziksel tehlikelere karşı güvenilir bir şekilde üretiminin ve tüketiminin sağlanması disiplini. Yani gıda güvenliğinin temel amacı tüketicinin sağlığının korunmasıdır (27). Etkin bir gıda güvenliği için, bir gıda zincirinde görev alan herkesin (tüketiciler, yöneticiler, yetiştiriciler, üreticiler, dağıtımıcılar ve medyanın), özellikle de devletin ve gıda işletmelerinin üzerine düşen sorumluluğu yerine getirmesi gerekmektedir (26, 28).

Besinlerde kimyasal bir tehlike olan belirtilmiş ilaç kalıntılarına karşı tüketici sağlığının etkin biçimde korunabilmesi için, her çeşit hayvansal besinde bulunacak ilaç kalıntısı çeşitleri ve kirlenme düzeylerinin sınırlandırılması son derece önem taşır. Tüketiciler için risk olması muhtemel bir ilacın ana maddesinin veya metabolitlerinin gıdalarda kalıntılarının birikimi ile sonuçlanmaması için, veteriner ilaçlarının nasıl ve ne şekillerde kullanılacağına çok iyi bilinmesi gerekmektedir (29). Bu nedenle, bilimsel ve yasal denetime temel oluşturacak şekilde, hayvanlarda çeşitli amaçlarla (sağaltıcı, koruyucu, gelişmeyi hızlandırıcı gibi) kullanılan her veteriner hekimliği ilacı için,

- Kullanımı yasaklanmış olanlar her ne sebeple olursa olsun kullanılmamalıdır,
- İzin verilenlerin ise,
 - Hayvanlara uygulanacak en yüksek dozları,
 - Sağaltım süreleri,
 - Su veya yemlere katılan en yüksek miktarları,

İlaç 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 bilinmelidir (30).

Ülkemiz gıda üretiminde önemli yere sahip olmakla birlikte, üretilen gıdaların güvenilirliği ve kalitesi bakımından ciddi sorunlar yaşanmaktadır. Tüketilen gıdaların sağlıklı koşullarda üretilmesi ve insan sağlığına zarar vermeyecek bir içeriğe sahip olması gibi konular kamuoyunda oldukça fazla tartışılmaktadır (27). Yetiştiricilerin bilinçsizce ilaç kullanması, bu kullanılan ilaçlardan özellikle de antibiyotik grubu ilaçların, veteriner hekim reçetesi ve uygulaması dışında satılması ile kullanılmasına yönelik denetimlerinde yetersiz olması, ülkemiz hayvan ve dolayısı ile de insan sağlığına zarar vermeye devam edecektir.

Türkiye 2013 gıda güvenliği vizyonunu ve hedeflerini, mevcut biyo çeşitlilik ve hammadde zenginliğini, güçlü üretim ve işgücü potansiyeli ile değerlendirerek, AB mevzuatıyla uyumlu çiftlikten sofraya yaklaşımı ve izlenebilirlik çerçevesinde üretim yapmak, işletmeleri gıda güvenliği mevzuatının gerekliliklerini sağlayabilecek yapıya ve donanımına ulaştırmak, yetkilerin tek merkezde toplandığı güçlü bir yapılanma ile kamu kontrol/denetim sistemlerini etkin bir şekilde yürütmek, eğitim ve yayın hizmetlerini geliştirmek, Ar-Ge çalışmalarından elde edilen bilimsel verilere dayalı sürdürülebilir gıda güvenliği sistemini oluşturarak tüketici beklentilerini karşılayan güvenli gıdaları iç ve dış piyasalara sunmak olarak belirlemiştir (31).

Özellikle besin değeri olan hayvanlardan sağlanan et, süt, yumurta, bal gibi besinlerde ilaç kalıntılarının bulunması, gıda güvenliği konusu içindeki güncelliğini korumaktadır. Bu durumda, veteriner hekimliği ilaçlarının hayvanlarda bilinçli ve kontrollü kullanımı sağlanarak, hayvansal kaynaklı besin maddelerinin ilaç kalıntılarıyla kirlenme tehlikesi ve boyutu en aza indirilebilir.

Ülkemiz kanatlı sektöründe sıklıkla kullanıldığını düşündüğümüz enrofloksasinin üyesi olduğu kinolon grubu antibiyotiklerin gıda patojenlerinde antibiyotik dirençliliğini arttırması, kloramfenikolün kan anomalilerine yol açması ve nitrofuranın da özellikle teratojenik etkileri, bu antibiyotiklerin halk sağlığı üzerindeki önemini ortaya koymaktadır. Özellikle insanlar üzerinde bu tür önemli yan etkileri olan enrofloksasin, kloramfenikol ve

nitrofuranın ülkemiz özel sektörü kümes içi uygulamalarında yaygın olarak kullanılması, çalışmamızda bu antibiyotik kalıntılarının aranması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Antibiyotik kalıntılarının neden olduğu sağlık riskleri göz önüne alındığında ülkemizde hayvansal ürünlerde antibiyotik kalıntısı konusunda çok az çalışma yapılması dolayısıyla, önemli bir protein kaynağı olan tavuk etinde kalıntıların tespitine yönelik araştırmaların gerçekleştirilmesi gerektiği de çok açıktır (8, 32).

Çalışmanın gerçekleştirilmesindeki amaç; ülkemiz kanatlı sektöründe kullanılan ve halk sağlığı üzerinde önemli etkileri olan enrofloksasin, kloramfenikol ve nitrofuran antibiyotiklerinin kalıntılarının, değerli bir protein kaynağı olan ve sıklıkla tükettiğimiz piliç etlerinde ve karaciğerinde varlığını araştırmak, gıda kontrol hizmetlerinde bu konuya dikkat çekmek ve yasal düzenlemeler çerçevesinde bu konuda tüketici sağlığına yönelik riskleri ortaya koymaktır.

GENEL BİLGİLER

Beslenme ve Üretim Arasındaki İlişki

Yaşamamızın temeli olan beslenmede, proteinler önemli bir yer tutmaktadır. Proteinler en yeterli ve dengeli şekilde hayvansal kökenli gıda maddelerinde bulunabilmektedir (33). Dolayısıyla çocukların bedensel gelişiminin yanı sıra zeka gelişimi için de gerekli olan proteinler açısından zengin hayvansal kökenli gıda maddelerinin tüketim düzeyinin arttırılması son derece önemlidir.

Günümüzde; dünya nüfusunun hızla artmasına bağlı olarak besin maddelerine olan ihtiyacın artması, artan besin maddesi ihtiyaçlarının da karşılanması hayvansal ve bitkisel ürünlerin arttırılması ile gerçekleştirilmektedir (34). Bu bağlamda artan nüfusun dengeli ve yeterli beslenmesi için de verimli ve kaliteli bir üretimin sağlanabilmesi son yıllarda bütün dünya ülkelerinin gündeminde yer alan en önemli konulardan biri haline gelmiştir (35).

Üretimde artış ancak birim alandan veya hayvandan elde edilen ürünlerin artması ile mümkün olabilmektedir. Birim alandan alınan veya hayvan başına sağlanan verimin maksimum düzeyde olması için, günümüzde entansif ve monokültür ziraat yoğun bir şekilde uygulanmaktadır. Yalnız, bu üretim şeklinin uygulanmasındaki tek amaç, birim hayvandan veya alandan alınacak verimin arttırılmasıdır. Halbuki gerçekleştirilen bu yöntemde, kimyasal tarım ilaçlarının, katkı maddelerinin ve sentetik gübrelerin kullanımı, ormanların kesilerek bu alanlarda üretim yapılması, hayvanlardan yüksek verimler elde etmek için kullanılan sentetik hormonlar, yem katkı maddeleri, antibiyotikler vb. uygulamalar artık günümüzde hayvanlarda, bitkilerde ve insanlarda hatta yeryüzündeki tüm canlılarda zararlı etkilerini göstermeye başlamıştır (34).

Kanatlı Eti, Üretimi ve Tüketimi

Et ve et ürünleri deyince, tavuk, balık, sığır, koyun ve domuzun iskelet dokuları ile diğer hayvanların etleri olarak anlaşılır. Bu hayvanların salgı bezleri, dil, karaciğer, kalp, böbrek ve beyin gibi diğer organları da, bu tanım içine girmektedir (36). Tanımda yer alan özellikle karaciğer başta olmak üzere sakatatlar, ülkemizde sık tüketilen gıda maddeleri arasındadır (37).

Et tanımı içerisinde yer alan tavuk etleri (broiler), bu hayvanların hızlı büyümeleri, hastalıklara olan dirençlilikleri, gevreklik ve tadı gibi iyi et kalite özelliklerinden dolayı yetiştiricilikte ve tüketimde tercih edilmektedirler. Tüm bunların yanında, 1.8 kg gibi bir ağırlığa da, piliç başına yaklaşık 3.8 kg yem tüketerek ulaşmakta olduklarından yetiştiriciler için ekonomik bir ürün olarak ele alınmaktadır (36).

Tavukçuluk sektöründe de amaç; düşük üretim giderlerinde çalışarak, üretim ve verimi arttırmaktır. Bu amaç doğrultusunda ilerleyen teknoloji ile birlikte tek bir taşıyıcı hat üstünden, bir saat içinde 12.000 tavuk kesmek, 9.000 adet tavuğun da yenilebilir iç organlarını çıkartmak mümkün hale gelmiştir (38).

Kırmızı et üretiminin giderek azalmasıyla ortaya çıkan hayvansal protein açığı, tavuk eti üretimindeki artışlarla dengelenebilmiştir. Ülkemizde kişi başına piliç eti tüketimi 1990 yılında 3.8 kg iken, 2007'de 15.2 kg'a yükselmiştir. AB ülkelerinde ise ortalama tüketim kişi başı 26 kg'ın üzerindedir (39).

Dünya'da tavuk eti üretimi ve tüketimi son 20 yıl içerisinde yükselen bir seyir izlemektedir. 1990-1998 yılları arasında; dünya kanatlı eti tüketimi yıllık % 4.4 oranında artmıştır. 1998 yılı içinde yaklaşık 40 milyon baştan fazla tavuk, et ihtiyacı için yetiştirilmiş ve kesilmiştir (38).

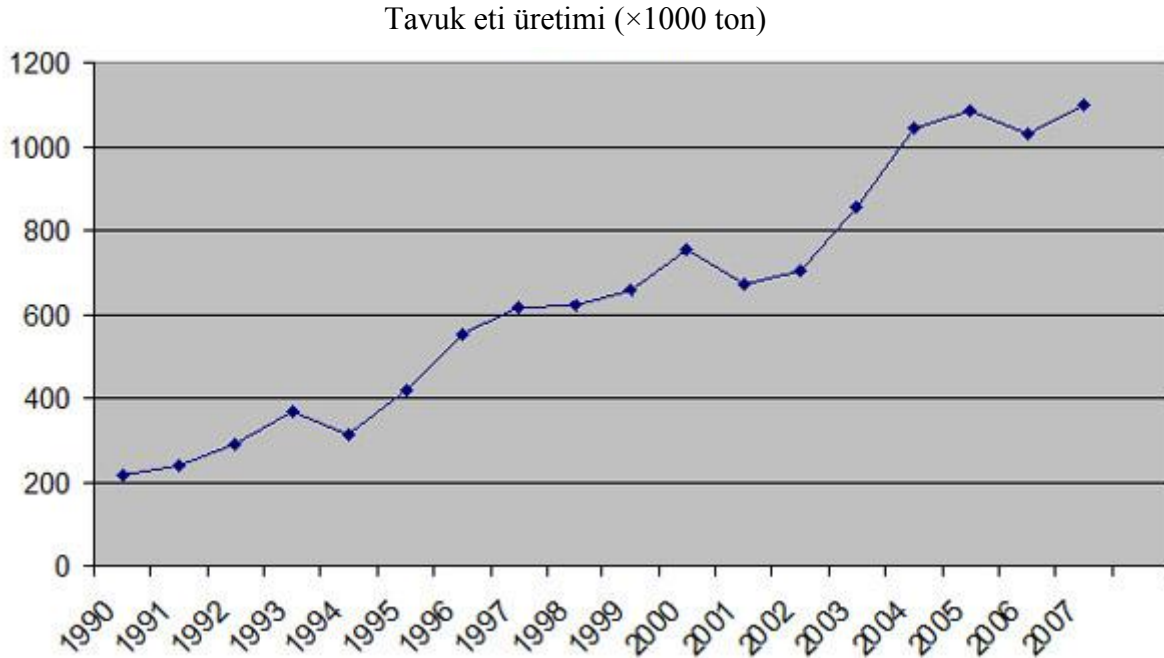
Food and Agriculture Organization (FAO)'ın 2005-2008 yılları arasında tavuk eti üretim miktarları ve yıllar arasındaki artışları gösteren bilgileri aşağıda Tablo- 1'de verilmiştir. Bu tabloda 2008 yılında dünyada yaklaşık olarak 50 milyon tondan fazla tavuk eti üretildiği görülmektedir (40).

Tablo- 1: Dünya tavuk eti üretimi (metrik ton) (40)

	2005	2006	2007	2008
Amerika	15.869.000	15.930.000	16.211.000	16.677.000
Çin	9.964.490*	10.163.929*	10.615.020*	11.054.320*
Brezilya	7.865.780	8.164.003	8.988.035	10.215.500
Meksika	2.436.534	2.463.797	2.542.493	2.580.779
Hindistan	1.900.000*	2.000.000*	2.240.000*	2.490.000*
Rusya	1.345.725	1.580.160	1.868.889	2.000.675
İran	1.237.000	1.360.000	1.400.000F	1.400.000F
Japonya	1.273.141	1.366.667	1.366.102	1.366.102F
Endonezya	1.125.710	1.260.148	1.295.840	1.358.390
İngiltere	1.333.789	1.288.832	1.270.170	1.259.060
Arjantin	1.010.000	1.159.000	1.160.000F	1.160.000F
İspanya	1.083.968	1.064.944	1.131.031	1.155.000*
Türkiye	936.697	917.658	1.068.230	1.040.580
Kanada	1.000.077	997.482	1.028.230	1.040.580
Tayland	950.000	961.930	985.997	1.018.844

*Resmi olmayan sonuçlar

F: FAO Tahmini



Şekil- 1: Türkiye yıllara göre tavuk eti üretim grafiği (39)

Ülkemizde de, tavuk eti üretimi, dolayısıyla da tüketimi ve kesilen hayvan sayısı Şekil-1 ve Tablo- 2’de görüldüğü gibi yıllar içerisinde artmaktadır. Türkiye’de beyaz et üretimi, bir önceki yıla göre % 17.9 artarak 1.323.624 tona ulaşılmıştır. Bu miktarın % 96.48’i broiler (et tavuğu), % 1.23’ü yumurta tavuğu, % 2.28’i hindi ve % 0.01’i ise ördek etinden oluşmaktadır (5). Bu rakamlara ek olarak yılda ortalama üretilen 10 milyar adet yumurta olduğu da düşünülürse, bu sektörün ülkenin bir numaralı hayvansal protein kaynağı durumuna eriştiğini söylemek mümkündür. Türkiye’nin hayvansal protein açığını kapatmada en etkili çözüm tavuk eti ve yumurta üretimidir. Kanatlı eti ve yumurta ülkemiz insanlarının dengeli beslenmeleri için stratejik bir öneme sahiptir (39).

Tablo- 2: Türkiye’de son 15 yılda kesilen broiler ve üretilen et miktarı (5)

	Et Tavuğu - Broiler	
	Kesilen Hayvan Sayısı (Adet)	Et (Ton)
1995	208.034.736	270.445
1996	250.034.440	406.698
1997	305.745.000	464.928
1998	301.549.100	476.719
1999	371.711.450	589.981
2000	411.200.300	639.342
2001	369.604.727	612.744
2002	414.707.710	694.060
2003	506.107.632	862.956
2004	505.412.926	866.862
2005	531.700.102	925.900
2006	490.394.162	910.226
2007	598.474.659	1.059.483
2008	604.322.129	1.069.696
2009	704.884.526	1.277.082

Tavuk Eti ve Yapısı

Dünya kanatlı eti üretiminin yaklaşık % 90’ını piliç eti oluşturmaktadır. Yüksek besleyici değere sahip olması, ekonomik ve kolay hazırlanabilirliği ile tüketimine ilişkin dini bir kısıtlamanın olmaması nedeniyle de tüm dünyada tüketimi oldukça fazladır (4). Tavuk eti önceleri bir yan ürün olarak yaşlı, yumurtacı tavukların veya horozların kesilmesi ile elde edilirken son yıllarda, kasaplık piliç (broiler) yetiştiriciliği bir yan üretim olmaktan çıkarak gelişmiş ve bir endüstri halini almıştır (2, 3).

Broiler eti beyaz renkte, gevrek ve aromadan zengindir. Kasaplık piliçler, henüz cinsel olgunluğa gelmeden kesilen 41-56 günlük erkek veya dişi özel ırk tavuk veya onların hibritleridir (900-1500 g). Bu hayvanların etleri daha çok ızgaralık ve kızartmalık olarak tercih edilir. Cinsel olgunluğa erişmiş tavuk ve horozların etleri ise kuru, sert ve lastik gibi olduğundan daha çok haşlamalık olarak kullanılır. Yaş tayininde özellikle iskelet sisteminin durumu ve konsistansı dikkate alınır. Genç hayvanlarda sternumun kaudal ucu yumuşak, elastik ve bükülebilir durumdadır (2, 3).

Tavuk Etinin Besin Değeri ve Beslenmedeki Önemi

İyi bir protein kaynağı olan tavuk etinin besin değeri ve bileşimi ırk, yemleme, yaş, cinsiyet, üretim yöntemleri, işleme şekli vb. birçok faktörden etkilenmekte olup, ayrıca gövdenin bölümlerine ve pişirme metoduna bağlı olarak da değişebilmektedir. Tavuk eti sadece iyi bir protein kaynağı olmayıp, aynı zamanda kırmızı etten daha çok protein de içermektedir. İç organları hariç, pişmiş tavuk etinin karkasın bölümlerine ve hazırlama metoduna bağlı olarak % 25-35 arasında protein içerdiği saptanmıştır. Diğer taraftan sığır eti % 21-27, domuz eti % 23-24 ve kuzu eti % 21-24 protein içerir. Tavuk etinin proteinleri insan beslenmesi için gerekli olduğu bilinen tüm esansiyel amino asitleri yeterli miktarda ve dengeli oranlarda bulundurmaktadır. Bu nedenle protein kalitesi, sindirilme oranı ve biyolojik değerliliği de yüksektir (3).

Tavuk etleri doymamış yağ asitlerini kırmızı etteki yağlardan daha yüksek bir oranda, fakat bitkisel orjinli sıvı veya katı yağlardan daha az oranda içerir. Tavuk yağının yaklaşık % 70'i doymamış yağ asitlerinden oluşmakta olup, tavuk kas ve yağ dokularının ruminantlarınkinden daha yüksek oranlarda linoleik asit içerdiği bilinmektedir. Tavuk etleri kolesterol bakımından da fakir olduğundan kalp damar hastalıkları için iyi bir besin kaynağıdır. Diğer besin maddelerine oranla daha düşük kalorili olması nedeniyle kiloyu kontrol eden diyetler, nekahat devresindeki kişiler ve fiziksel olarak aktivite göstermeyen yaşlı kişiler için de ideal bir besin maddesidir (3).

Bunların yanında B kompleks vitaminleri, riboflavin ve niasin bakımından zengin olması ve düşük sodyum içeriğine sahip olması ile tavuk eti temel beslenmede çok önemli bir besin maddesidir (3).

Veteriner Hekimliğinde İlaç Kullanımı

Veteriner ilaçları ve yemlere katılan katkı maddeleri gibi farmakolojik etkili maddeler, veteriner hekimliği ve hayvan yetiştiriciliğinin önemli ihtiyaçlarından biridir (50). Kullanılan farmakolojik etkili maddelerden en önemlisi de antibiyotiklerdir. Antibiyotikler ilk olarak tetrasiklin fermentasyon yan ürünlerini yiyen tavukların daha hızlı büyüdüğüünün anlaşıldığı 1940'lı yılların sonu ve 1950'li yılların ilk yıllarında, büyütme faktörü amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Tetrasiklinleri takiben de büyümeyi hızlandıran ve performansı arttıran pek çok ilaç uygulamaya girmiştir (30, 38, 41, 42, 43).

Etlik piliç üretimi yapan kanatlı endüstrisinde de, kümes içi sağlığını iyileştirici ve üretimi arttırıcı olarak kullanılan bu maddeler ile etkili bir tavuk üretim sistemi oluşturulmuş, böylece yüksek kalitede et ve yumurta üretimi gerçekleştirilerek tüketicilerin daha uygun fiyatlarda ürün temin etmeleri sağlanmıştır (44). Özellikle antibiyotiklerin kullanılması ile, geçmişte hayvanlarda önemli telefata ve ekonomik kayba yol açmış olan birçok hastalık, bugün daha ortaya çıkmadan engellenebilmektedir (30).

Hayvanlarda hastalıkların sağaltımı ve önlenmesi, gelişmenin hızlandırılması, verimin ve yemden yararlanmanın arttırılması, paraziter hastalıkların kontrolü, kilo artışı sağlamak ve beslenmenin desteklenmesi amacıyla aşağıdaki etki mekanizmaları temel alınarak çok sayıda ilaç, hormon, vitamin, mineral vb. maddeler kullanılmaktadır (30, 41, 45, 46).

Etki Mekanizmaları

Büyütme faktörü olarak kullanılan antibiyotik ve benzeri maddelerin etkileri tam olarak açıklanamasa da, buna ilişkin çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Bu görüşlere göre üretim içinde kullanılan bu ilaçların;

- 1) Besin maddelerinin emilimini engelleyen toksik metabolitlerin üretimini inhibe ederek,
- 2) Gastrointestinal sistemdeki patojen mikroorganizmaların gelişimini engelleyerek,
- 3) Subklinik infeksiyonları azaltarak veya önleyerek etkili oldukları düşünülmektedir (41).

Kullanım Yoğunluğu

Besin maddesi olarak etinden faydalandığımız hayvanların yem ve sularına, hastalık ve parazitlerden korunabilmeleri için, belirli aralıklarla antibiyotikler katılmaktadır (34). Özellikle etlik civciv ve piliçler yaşamları süresince bir veya birkaç ilaca yine bir ya da birkaç kez maruz kalmaktadırlar (30). FAO raporlarında da hayvanların % 80'inin yaşamlarının belli dönemlerinde veya tamamında, tedavi esnasında, içme suları ve yemleri ile bu tür ilaçları aldıkları belirtilmektedir (45).

İran'da 1996-2003 yılları arasında oluşturulan kayıtlara göre, 7.290.317 kg antibiyotik kullanıldığı bildirilmiş olup bu rakamın da yaklaşık olarak % 20'sinin (1.513.794 kg) enrofloksasin olduğu belirtilmiştir (48).

Bu bilgiler ışığında dünya antibakteriyel ilaç pazarının 100.000 ile 200.000 ton arasında olduğu tahmin edilmektedir. Son 50 yıl içinde 1 milyon ton antibakteriyel madde dünyaya salınmış ve bunun % 50 kadarının veteriner ve tarım kaynaklı olduğu belirlenmiştir (47). Dünya üzerinde üretilen veteriner ilaçlarının % 30'u domuz, % 27'si sığır ve % 26'sı da kanatlı yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır (49).

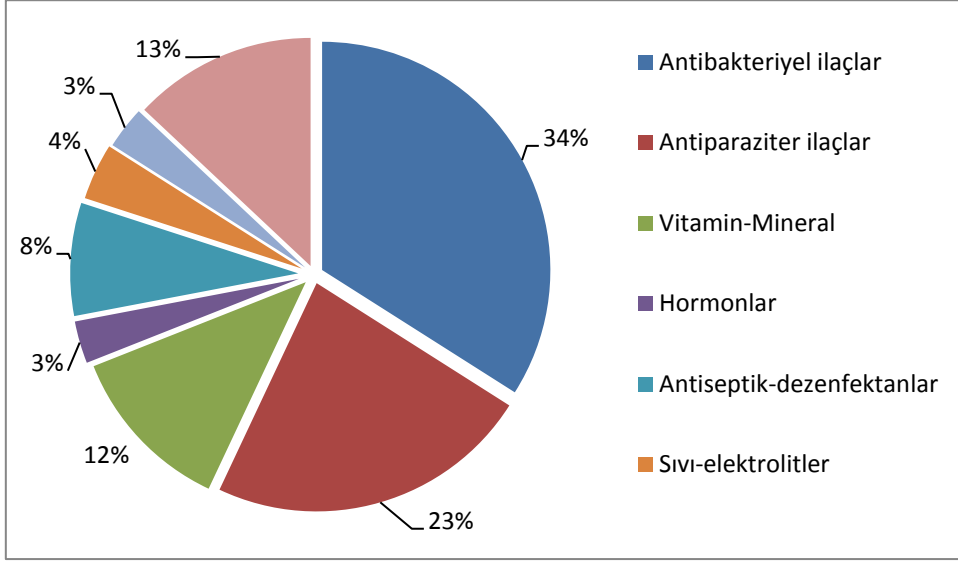
Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde kullanılan antibiyotiklerin % 84'ünün hayvancılıkta, bunun da % 78.5'inin çiftlik hayvanlarında profilaktik ve büyüme hızlandırıcı olarak, % 5.7'nin ise çiftlik hayvanlarının tedavisinde kullanılmakta olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, antibiyotiklerin çok az miktarının (% 0.01), bazı bitkileri bakteriyel patojenlerden korumak amacıyla pestisit olarak; % 2.8'inin küçük hayvan hekimliğinde kedi ve köpeklerin tedavisinde ve % 13'ünün insanların tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (50).

Hayvan yetiştiriciliğinde ve veteriner hekimliği uygulamaları sırasında bu kadar sıklıkla başvurulan ilaçlara ait bilgiler Tablo- 3'te verilmiştir.

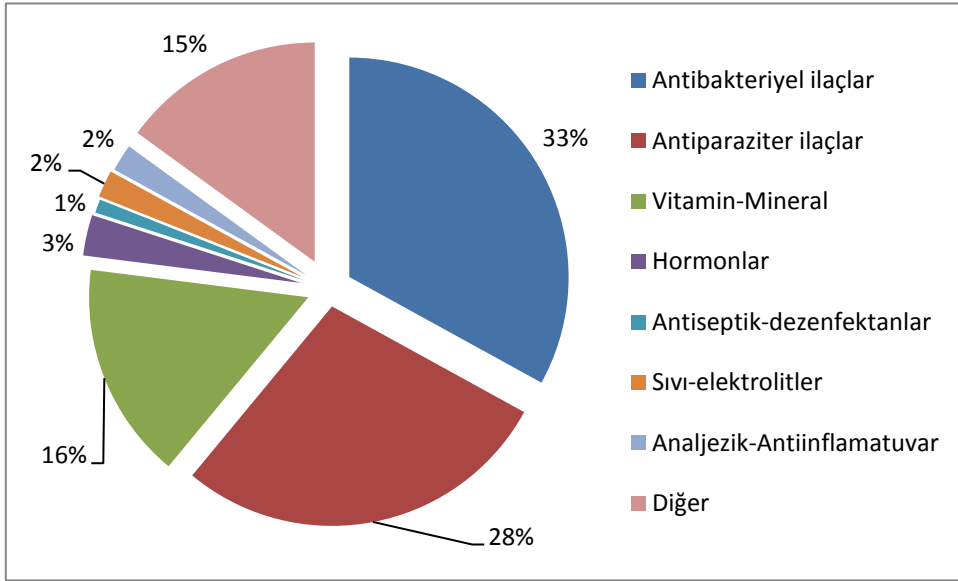
Tablo- 3: 2004 yılında Avrupa’da et üretimi (beyaz, kırmızı, balık vb.) ile kullanılan ilaçlar ve dağılımları (21)

Ülke	Et Üretimi (×1000 t)	Antibiyotik (t)	Antiparazitik (t)	Hormon (t)
Danimarka	2149	111	0.24	0.03
Finlandiya	377	13.3	1.8	0.0
Fransa	5869	1179	28.5	0.7
Almanya	6612	668.8	46.3	0.67
İsveç	536	16.1	3.86	0.28
Hollanda	2321	453	11.3	0.3
İngiltere	3329	414	10.84	0.48
Ara Toplam (Rapor Edilmiş)	21193	2855.2	61.24	1.46
Tahmin Edilen Bilgiler				
Avusturya	837	113	4.1	0.10
Belçika	1320	178	6.4	0.15
Kıbrıs	66	9	0.32	0.008
Çek Cumhuriyeti	755	102	3.7	0.09
Estonya	54 7	0.26	0.006	
Yunanistan	485	65	2.4	0.06
Macaristan	909	123	4.4	0.11
İrlanda	981	132	4.8	0.11
İtalya	3556	479	17.2	0.41
Letonya	73	10	0.35	0.008
Litvanya	195	26	0.94	0.02
Lüksemburg	22	3	0.11	0.003
Malta	16	2	0.08	0.002
Polonya	3152	425	15.3	0.36
Portekiz	693	93	3.36	0.08
Slovakya	291	39	1.41	0.03
Slovenya	127	17	0.62	0.015
İspanya	5308	715	26	0.61
25 Avrupa Ülkesi	40034	5393	194	4.63

Türkiye’de veteriner ilaç ruhsatlarının ana ilaç gruplarına göre dağılımı Şekil- 2’ de, tüketiminin ana ilaç gruplarına göre dağılımı ise Şekil- 3’te gösterilmiştir.



Şekil- 2: Ruhsatların ana ilaç gruplarına göre dağılımı (22)



Şekil- 3: Tüketimin ana ilaç gruplarına göre dağılımı (22)

Kalıntılar ve Oluşumları

Besin maddelerine kimyasal maddelerin bulaşmasının önüne geçilmesi ve kontrollerinin zor olması nedeniyle, mikrobiyolojik etkenlerin yarattığı tehlikeye oranla kimyasal maddelerin tehlike potansiyeli daha büyüktür. Bu kimyasal maddelerden olan antibiyotikler, organizmada tam metabolize olamadıkları ve tam olarak atılmadıkları için tüketicilerin sağlığını yaşam boyunca olumsuz etkilerler (2, 51).

Hayvansal ve bitkisel üretimde veya bunların çevresinde kullanılan ilaç ve kimyasal maddelerin birçoğu uygulandıkları alanlarda ve dahil oldukları canlıların vücudunda kısmen parçalanarak etkisiz veya zararsız hale gelmektedirler. Bazıları da son derece yavaş ayrışmaları nedeniyle, giderek artan miktarlarda birikim gösterirler (30, 51). Özellikle hayvan sağlığında belirtilen yararları içermeleri ile birlikte, yoğun kullanım alanı bulunan antibiyotiklerin organizmadan atılma süreleri dikkate alınmadığı zaman tükettiğimiz hayvansal orijinli besin maddelerinde “kalıntı (rezidü)” bırakırlar (45). Doku ve organlardaki tolerans düzeyinin üzerindeki tüm kalıntılar da, tüketiciler için toksikolojik yönden önem taşırlar ve tehlikeli kabul edilirler (30, 52).

Hayvansal gıdalardan geçebilecek “ilaç kalıntısı” tanımını yapmamız gerekirse; ilaç ve diğer kimyasal maddelerin hayvanlarda hastalıkların sağaltımı, önlenmesi ve kontrolü ile gelişmenin hızlandırılması amacıyla doğrudan veya dolaylı olarak kullanılmalarını takiben, bu maddelerin et, süt, bal, yumurta ile yenilebilen diğer doku ve organlar gibi hayvansal besinlerde biriken veya depolanan farmakolojik etkiye sahip değişmemiş halleri, metabolitleri, parçalanma ürünleri ile serbest veya bağlı haldeki maddeleri kalıntı olarak tanımlanmaktadır (4, 30).

İlaç Kalıntılarının Sebepleri

Gıdalarda bazı maddelere ilişkin kalıntılar, önceden bu maddelerle bulaşık yem veya yem hammaddelerinin yenilmesi ya da suların içilmesinin bir sonucudur. Özellikle kanatlılar olmak üzere, tüm çiftlik hayvanlarından kaynaklanan gıda kalıntıları ve onların yarattığı olumsuz etmenler aşağıda sıralanan ortak nedenlerden kaynaklanır: (30, 41, 53-56)

- Doz aşımı-ilaç yüklemesi yapılması (gereğinden fazla miktarda ilaç kullanılması, yem ve suyla birlikte aynı zamanda ilaç verilmesi),
- İlaç uygulanan hayvanların, ilacın formülasyonu, verilme yolu vb. durumlara göre, belli bir süre geçmeden veya bekletilmeden kasaplık olarak kesilmesi ya da böyle hayvanlardan elde edilen et, süt, yumurta ve bal gibi besinlerin tüketilmesi,
- Hayvanlarda onanmamış-ruhsatsız ilaç kullanılması,
- İlaç prospektüsüne (doz ve süre) veya veteriner hekimin talimatına uyulmaması (etiket dışı ilaç kullanımı da dahil),

- Hatalı ilaç, uygulama yolu veya formülasyon seçilmesi ve kullanılması,
- Veteriner hekimlerin sağaltım amaçlı olarak antibiyogram yapmadan ilaç vermeleri,
- Beşeri hekimlikteki ruhsatlı ilaçların (kansere sağaltım ilaçları, kalp glikozitleri, insülin gibi) hayvanlarda da kullanılması,
- İlaç kullanılan hayvanlarda ilacın vücuttan atılmasını yavaşlatan hastalık vb durumların (böbrek yetmezliği gibi) bulunması,
- İlaçlı yemlerin kaza yolu ile karıştırılma ve yedirilme hataları

FDA'nın, ABD'nde etlerdeki kalıntıların boyutu ve sebeplerine yönelik yaptığı incelemelere göre, kalıntı sebebinin % 76'sının kesim öncesi bekletme süresine uyulmaması, % 12'sinin yem fabrikalarında beyana esas yemlerdeki karıştırma veya ambalajlama hataları olduğu, % 6'sının farklı yemlerin konulduğu depoların iyi temizlenmemesi ve % 6'sının da ilaçların hatalı kullanılmasından (etiket-dışı ilaç kullanımı da dahil) ileri geldiği ortaya konulmuştur (30).

İlaç Kalıntılarının Olumsuz Etkileri

Hayvanlarda sağaltıcı, koruyucu ve geliştirici amaçla kullanılan ve hayvansal ürünlerde kalıntı bırakan farmakolojik etkili maddeler, organizmada tam metabolize olmadıkları ve tam olarak atılmadıkları için başta böbrek ve karaciğer olmak üzere yenilebilir çeşitli organ ve dokularda birikerek, tüketicilerin sağlığını sürekli ve hatta yaşam boyunca olumsuz etkilerler (45, 51).

Antibiyotikler de yanlış uygulamalar sonucunda et, sakatat, süt, yumurta, peynir, tereyağı ve diğer hayvansal ürünlerde tespit edilebilir miktarlarda birikim yapmaktadır (6, 57). Gıdalarda bulunan kalıntılar, başta patojenlerin antibiyotiklere direncini geliştirmekte (dirençli suşlar), antibiyotiğin çeşit ve miktarına bağlı olarak hafif alerjiden başlayıp anafilaktik şoka kadar gidebilen klinik tabloları da beraberinde getirmektedir (18, 45, 51).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yayınladığı bir raporda antibiyotiklerin hatalı kullanımını sonucu, bu ilaçlara karşı mikroorganizmaların bağışıklık kazandığı belirtilmiştir. Yapılan araştırmalarda da insanlara geçen antibiyotik kalıntılarının vücuttaki dirençsiz ve zararsız bakterileri öldürerek, güçlü ve zararlı bakterilerin çoğalmasına sebep olduğu ve hastalık esnasında kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisiz kaldığı gözlenmiştir (34).

Kalıntıların insanlar üzerindeki başlıca etkileri şunlardır (2, 16, 23, 30, 32, 38, 41, 43, 45, 51, 58, 59):

- İnsanlarda hafif bir alerjiden başlayarak anaflaktik şoka kadar değişen şiddette zehirlenmelere ve etkilere (teratojenik, mutajenik, karsinojenik etkiler gibi) neden olabilir ki, penisilin ile mastitis tedavisi gören ineklerin sütlerini içen penisiline duyarlı kişilerde alerjiler görülmüştür. Kloramfenikol de, 1/20-100 bin oranında ölüme götürecektir aplastik anemi ile kemik iliğini baskı altına alabilir.
- Cinsiyet özellikleri ve davranışlarda değişikliklere (dişilerde erkeksi, erkeklerde dişimsi davranış, belirti ve özelliklerin ortaya çıkması gibi) yol açabilir.
- Üreme bozukluklarına neden olabilir.
- Özellikle yoğurt, peynir ve sucuk imalatı olmak üzere, besin endüstrisinde starter kültürlerin üremesini engelleyerek üretim hatalarının ortaya çıkmasına ve ekonomik kayıplara yol açabilir.
- Bağırsak içeriğinde yaklaşık 1×10^{11} /g bakteri (400'den fazla tür vardır; bunların % 90'dan fazlası obligat anaerobik, 30 tür içerisinde bilhassa *Bacteriodes*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* olmak üzere) bulunur ve bunlar mevcut doğal florayı oluşturur. Bunların sindirim işlemine yardımcı olmaları yanında, hastalık yapıcı bakterilerin üremeleri ve girişine engel olmak gibi önemli fizyolojik görevleri vardır. Tüketicilerde kalıntılar yolu ile alınan ilaçlar, ince ve kalın bağırsaklardaki bakteri topluluğunun değişmesine yol açarak doğal flora zarar verebilirler.

Sindirim kanalında bu tarz istenmeyen bir etkiye yol açmamak için, kalıntı halinde en çok 1.5 mg/60 kg (canlı ağırlık) miktarında antibiyotik alınmasına izin verilir. Bu miktar da bir insanın günde 1.5 kg besin tüketeceği ve 1 kg besinde bulunacak ≤ 1 mg antibiyotiğin de mikrobiyolojik bir zararının olmayacağı esasına dayanır. Bugün antibiyotiklerin kabul edilebilir günlük alım (KGA-ADI) miktarları ve tolerans düzeylerinin belirlenmesinde bu durum göz önüne alınmaktadır.

- Hayvansal orjinli gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntıları çeşitli patojen mikroorganizmaları baskı altında tuttuğu için, bu tür gıdaların bakteriyolojik laboratuvar analizlerinde yanlış değerlendirmelere neden olabilmektedir. Özellikle *Salmonella* türleri antibiyotiklerin etkisi altında maskelenir. Dolayısıyla *Salmonella* gibi patojen etkenlerin ette mevcut oldukları halde tespit edilememeleri ile, bu etkenler halk sağlığı açısından oldukça büyük tehlike yaratabilir.

- İlaç kalıntıları aynı zamanda mikroorganizmalarda direnç gelişimi de meydana getirmektedir. Bakteri, protozoa ve parazit türleri arasında dirençli tür veya suşların ortaya çıkmasına ve böylece ilaçların sağaltıcı ve koruyucu etkilerinin azalması ile ilaçların kullanım ömrünün kısalmasına yol açabilir. Birçok hastalığın sağaltımı veya önlenmesinde mevcut ilaçlarla yeterince başarı sağlanamaması yanında, bu durum dirençli bakterilere karşı etkili olabilecek ilaçların araştırılması-geliştirilmesi gereğine yol açmıştır. Dolayısıyla da ilaç sanayinde bu durum önemli bir harcama kalemi haline gelmiştir.

Direnç, yüksek biyolojik ilişki ve bakteriyel tür çeşitliliği nedeniyle genetik değişimlerin sık meydana geldiği alanlarda oluşur (60). Oluşan bu dirençlilik plazmidler, transpozanlar ve integronlar vasıtasıyla hücre bölünmesi sırasında vertikal olarak aktarılmaktadır. Bunun yanında karışık bakteriyel populasyonlardaki aynı veya farklı tür ve soylardaki patojen veya apatojen bakteriler arasında transdüksiyon, konjugasyon veya transformasyon vasıtasıyla horizontal olarak da geçmektedir (4, 23).

Yapılan çalışmalar, *Salmonella* 'ya direncin yıllardır artma eğiliminde olduğu, gıda zehirlenmelerinde artışların olduğu ve bunun da kanatlılarda kontrolsüz antibakteriyel kullanımıyla ilgili olduğunu göstermiştir. 2005'te Hollanda ve İngiltere'deki kanatlılardan izole edilen *Salmonella* suşlarının en yüksek oranda kloramfenikol, sulfonamidler ve tetrasiklinlere direnç gösterdiği ortaya konulmuştur (4, 38, 41).

Nitekim, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, shiga-toxin üreten *Escherichia coli*, *Listeria* ve *Yersinia* gibi gıda kaynaklı hastalıklara neden olan patojenlerin de direnç özellikleri ortaya konmuştur (17, 42, 51). Dirençli zoonotik patojen grubuna dahil bu bakteriler, hayvansal kaynaklı gıdaların tüketimi veya bu gıdalara temas yolu ile insanlara geçebilmektedir. Endüstrileşmiş ülkelerde bu yollarla oluşan enzootik hayvansal gıda kaynaklı enfeksiyonlara rastlanılmaktadır (17).

Bu mikroorganizmaların yanında, antibiyotiklerin hayvan yemlerinde gelişim arttırmak amacı ile kontrolsüz olarak kullanılması ile *Enterococcus faecium* türlerinde de direnç gelişimi gözlenmiştir (61-64). Bu amaçla hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin önemli bir kısmı insan tedavisinde de kullanıldığı için çapraz direnç kazanmaları söz konusu olmaktadır (61). Yıllarca probiyotik ve starter kültür olarak gıda teknolojisinde güvenle kullanılmış olan *Enterococcus*'lar antimikrobiyel ajanlara olan dirençleri nedeniyle fırsatçı patojenler olarak görülmektedirler (65-67). Düşük virülens özelliklerine sahip olsalar bile, virülens özellikleri ve antibiyotiklere karşı dirençleri birleştiğinde tedavileri de zor olmaktadır (68). Bir glikopeptid olan ve hayvanlarda yem katkı maddesi olarak kullanılan avoparcinin insan ve hayvan doğal barsak florasında yaşayan enterekoklarda direnç gelişimine (vankomisin-dirençli enterekoklar) neden olması ve bu dirençli bakterilerin insanlarda neden olduğu enfeksiyonların sayısındaki artışlar nedeni ile Amerika ve Avrupa'da yem katkısı olarak kullanılmasına yasaklama getirilmiştir (4, 69).

Bu dirençli patojenlerin ve direnç genlerinin hayvanlardan insanlara yayılması, insanlardaki enfeksiyonların tedavisi konusunda ciddi bir kaygı yaratmaktadır. Gıda üretiminde kullanılan hayvanlarda kullanılan florokinolonları da içeren antibiyotiklerin çoğu, gıda kaynaklı hastalıklara maruz kalan insanlarda tedavi amaçlı da kullanılmaktadır (17). Nitekim, dünya genelinde antibiyotik direnci yaygınlığının arttığı düşüncesi gelişmektedir ve bu artışın gelişmekte olan ülkelerde daha fazla olduğunu gösteren birçok çalışma da vardır (16, 58, 70). Gelişen bu direnç, mortalite oranlarını, tedavi giderlerini, hastalıkların yayılımını ve sürelerini arttırmaktadır (41, 70). Halk sağlığını korumak için dirençli bakterilerin hayvanlardan insanlara yayılmasının kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu da, hiç şüphesiz hayvanlarda antibiyotik kullanımının azaltılmasıyla başarılabilir (16).

- Birçok çalışma göstermektedir ki kalıntılar patojenik bakterilerin sayılarını ve dirençlilik seviyelerini artırmakla beraber aynı zamanda insan doğal florasında bulunan ve patojenik bakteriler için antibiyotik direnç genleri kaynağını oluşturan normalde zararsız kommensal mikroorganizma sayısını da arttırmaktadır (16).

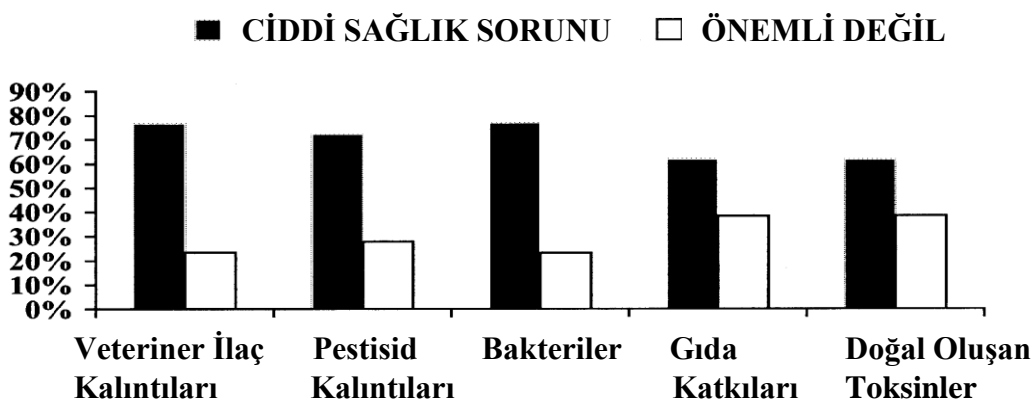
Yukarıda tüm ciddi olumsuz etkileri sayılan antibakteriyal kalıntılar hakkındaki endişeler, günümüzde gıda güvenliğinin odağını oluşturmakta ve veteriner ilaç kalıntılarının olağan bu zararlı etkileri halk sağlığının korunmasında önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (6, 17).

Tüketici Gözüyle Kalıntılar ve Gıda Güvenliği

Gıdalardaki kalıntılar, halk sağlığı açısından çok ciddi problemlere neden olmasına karşın kalıntı içeren besinlerin tüketilmesiyle karşılaşılan ve hekime başvurulmuş olayların sayısı son derece azdır (30, 54). Çünkü kalıntılar gözle görülmez, koklanmaz veya tadılarak anlaşılabilir oldukları için tespit edilmeleri zordur (54). Bu bilgiler ışığında tüketicilerde yenilebilir tavuk-kanatlı dokularında zararlı seviyelerde ilaç kalıntısı varlığının daha önemli ve dikkat edilmesi gereken bir gıda güvenliği sorunu olduğu algısı zamanla gelişmiştir (44).

Amerikalı tüketiciler, bilinçli ya da bilinçsizce yemlere katılmış olabilen katkı maddelerini büyük bir gıda güvenliği riski olarak görmektedirler (71). Amerika Gıda Satış Enstitüsü (FMI)'nün yaptığı bir araştırmada, market alışverişi yapan kişilerin % 95'inin gıdalardaki kalıntıları ciddi veya normal bir tehlike olarak gördükleri sonucuna varılmıştır (54).

Resurreccion ve Galvez'in (72) tüketiciler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, tüketicilerin % 77'sinin etlerdeki veteriner ilaç kalıntılarını diğer gıda kontaminantlarına (pestisit kalıntıları, bakteriler, gıda katkıları, doğal toksinler) kıyasla daha ciddi bir sağlık konusu olarak gördükleri ortaya konmuştur. Aynı ankete göre % 23'lük bir tüketici grubunun gıdalardaki ilaç kalıntılarını önemli bir sağlık problemi olarak görmedikleri sonucuna ulaşılmıştır (Şekil- 4).



Şekil- 4: Tüketici taraması; ette potansiyel gıda kontaminasyonları (72)

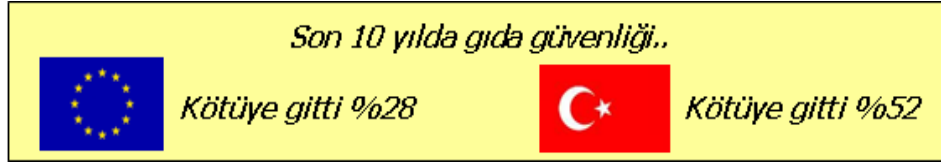
Ülkemizde ise, Gıda Güvenliği Derneği'nin 2008 yılında yayınladığı bir rapora göre, "Gıda yoluyla gelebilecek çeşitli riskler ile ilgili endişe duyulan konular" başlığı altında sorulan birçok tehlikenin içinde Türk tüketicisininin % 79'unun etlerdeki hormon ve antibiyotik

kalıntılarını “çok endişe verici” bir tehlike olarak gördükleri sonucu çıkmıştır. Aynı rapora göre Avrupa tüketicisinin yaklaşık yarısının, Avrupa Birliği’ndeki yasal otoritelerin kalıntı alt başlığını da içeren birçok gıda güvenliği riski konusunda yeterince tedbir aldığını düşündüğü; üçte birinin ise birlik içerisinde yapılan denetim ve uygulamaların yetersiz olduğu fikrinde olduğu belirtilmiştir. Buna karşın Türk tüketicisinin % 77’sinin yasal otorite tarafından yapılanların yetersiz olduğunu düşündükleri açıklanmıştır (73).

Yasal otorite tarafından yapılan uygulamalar yetersiz (%)



Gıda güvenliği konusundaki gelişmelerin 10 yıl öncesiyle kıyaslanması (%)



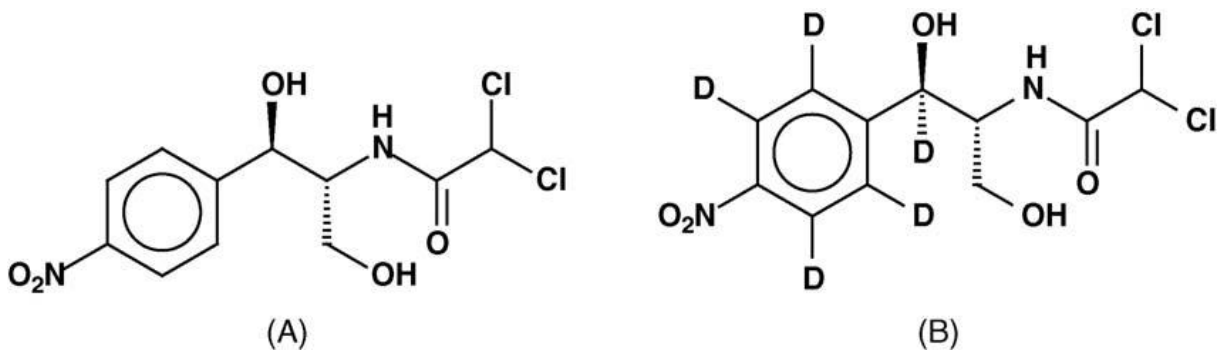
Kalıntı riskleri ve gıda güvenliği denetimleri konusunda kıyaslamalı olarak bakıldığında, Türk tüketicilerinin kalıntılar konusundaki algısının önemli seviyede yüksek olduğunu, genel algılarının da belki de ülkemizde ki denetleme mekanizmalarındaki eksikliklerden dolayı biraz daha karamsar olduğunu görmekteyiz (73).

Ülkemiz Tavuk Yetiştiriciliğinde Yaygın Olarak Kullanılan Antibiyotikler

Kloramfenikol, furazolidon ve enrofloksasin geniş spektrumlu veteriner ilaçları olup sırasıyla amfenikol, nitrofuran ve kinolon ana gruplarında bulunurlar. Bu ilaçlar, hayvanların tedavisinde yem katkısı olarak, hayvanların büyümesini ve verimliliklerini arttırmak için geniş çapta kullanılırlar. Gıdaların içerdiği veteriner ilaç kalıntıları, son yıllarda tüketiciler arasında ciddi tereddütler uyandıran bir sorun haline gelmiştir. Sonuç olarak bu bileşiklerin yenilebilir dokulardaki kalıntılarının analizleri, insan sağlığına yönelik risklerini değerlendirme açısından son derece önemlidir (74). Gıda üretimi için kesilmiş piliçlerde kalıntıları rapor edilmiş olan kloramfenikol ve nitrofuran AOZ yasaklı, enrofloksasin ise MKL’leri verilmiş olan ilaçlardır (55, 75-78).

Kloramfenikol

Kloramfenikol 1947 yılında Burkholder adlı bir araştırmacı tarafından *Streptomyces venezuelae* kültürlerinden elde edilmiştir. Bu ilaç, yapısının tayini ve kimyasal sentezinden sonra 1948-1949 yıllarında insan ve hayvan hastalıkları tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Kloramfenikol nitrobenzen ve diklorasetik asit türevi olan, [D - (-) - tiroo - 1 - p - nitrofenil - 2 - dikloro - aseta - mido - 1, 3 - propanediol] kimyasal yapılı bir antibiyotiktir. İlacın basit yapısı ve sentetik olarak eldesinin daha ekonomik olması, ilacın doğal yollarla üretimi yerine bu suni yolun seçilmesine neden olmuştur. *S. Typhosa*, *Hemophilus influenza*, *Bacterioides fragilis*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Brucella sp.*, *Pasteurella sp.*, *Shigella paradysenteria*, *Escherichia coli*, *Aerobacter acrogenes*, *S. pyogenes*, *Francisella tularenses*, *Proteus vulgaris*, *Riketsia spp.*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas aureginosa*, *Salmonella spp.*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Erysipelotrix rhusiopathia* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi birçok gram pozitif ve gram negatif patojenlerin neden olduğu hastalıkların sağaltımında bakterisid ve bakteriyostatik olarak kullanılan, bakterilerin protein sentezini etkileyerek çalışan, geniş spektrumlu bir ilaçtır (53, 79-85).



Şekil- 5: Kimyasal yapılar (A) CAP-kloramfenikol ve (B) CAP-D5 (likit kromotografide kullanılan iç standart) (86)

Söz konusu antibiyotiğin et, karaciğer, böbrek gibi dokulardaki kalıntıları kullanımın kesilmesini izleyen saatler içinde hızla yıkımlanmaktadır (30). Oda ısısında dayanıklı olup, ağız yolu ile verildiğinde sindirim kanalından çabuk emilmektedir. Kandaki en yüksek yoğunluğuna uygulama şekline göre 2-4 saat arasında geçmektedir. Oral yolla verilenden yarım veya bir saat sonra birçok dokuda varlığı saptanır (79).

Bazı pre-mikslerde ve ilaçla tedavi gerektiren formulasyonlarda, yemlerin veya suların içine katılarak birçok türe (kanatlı, tavşan, buzağı, domuz, koyun ve kuzular) verilmektedir (87). Gıda elde edilen tüm bu hayvanları tedavi etmek için, kullanılabilirliği yüksek ve maliyeti az olan bir ilaç olmasından dolayı tercih edilmektedir (83, 84). Özellikle tifo ve paratifo tedavisi ile *Salmonella* spp.'nin yol açtığı diğer hastalıklarda, bakteriyel menenjit ve beyinde gelişen apselerde, epiglottis, pneumonia ve riketsiosis gibi hastalıkların sağaltımında kullanılmaktadır (53, 79).

Keşfedildiği yıllarda bilhassa insan sağlığında tifo ve tifus etkenleri üzerine etkili olduğundan geniş kullanım alanı bulmuştur (79). Tifoyu ve dolayısıyla bu ilacı önemli kılan faktör, tifonun birçok ülkede yüksek oranda morbidite ve mortalite ile seyretmesi ile akut ve sistemik bir infeksiyon olmasıdır (88). İnsanlarda 3 hafta kadar süren, 40°C'ye çıkan yüksek ateş, baş ağrısı, bulantı, kusma, ishal, konstipasyon, dalak ve karaciğerde büyüme ile de seyredilen tifonun tedavisinde, bakterisidal etkili kinolonlara alternatif olarak *S. typhi* üzerinde bakteriyostatik etkisinden faydalanmak üzere 2-3 g/gün 14 gün dozlarında kullanılabilir (89).

Ancak bakteriler üzerinde yukarıda sayılan geniş etkileri yanında kloramfenikolün hızlı gelişen ciddi toksik etkileri de vardır (53, 84). Kloramfenikol, insan ve hayvan vücudunda bazı ilaçlarla etkileşime girebilir, bazı fizyolojik değerleri ve immun yanıtları değiştirebilir. Uzun süreli ve geniş ölçülerde kullanımı, bakteriyel direnç oluşumunu tetiklemektedir (79). Siyanosis sendromu ve yeni doğanlarda gelişebilen gri sendrom olarak da bilinen, kardiovasküler kollaps da oluşturduğu bilinmektedir. Özellikle fatal aplastik anemiye neden olan geri dönüşümsüz kemik iliği depresyonu oluşturmakta olup, kanserojen bir maddedir (51, 53, 74, 79, 83, 84, 85, 90).

S. Typhi'nin kloramfenikole ve ampisiline karşı son yıllarda artan oranda direnç kazandığı belirtilmektedir. Kloramfenikole karşı değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda % 1-90, ülkemizin değişik bölgelerinde gerçekleştirilen çalışmalarda ise, % 0-48 oranlarında direnç geliştiği bildirilmektedir (88). Dünya çapında ampisilin, kloramfenikol ve co-trimoksazol (trimethoprim-sulphamethoksazol) dirençli "multidrug resistant" *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype typhi tarafından her yıl yaklaşık olarak 16 milyon tifo vakası meydana gelmekte, 580.000'den fazla da ölüm vakası görülmektedir (70, 91).

Tifonun tedavisinde uzun yıllar kullanılan kloramfenikol, gelişen ilaç direnci, relaps (tekrar hastalanma) oranının yüksekliği (% 10-25), taşıyıcılık oranının fazla olması ve kemik iliğine toksik etkisi ile artık bu hastalığın tedavisinde ideal ilaç olmaktan çıkmıştır (88, 89). Bu nedenlerden dolayı da tifo tedavisinde siprofloksasin gibi yeni antibiyotiklerin kullanılması zorunlu hale gelmiştir (88).

İçme sularına 5 gün süre ile 40 mg/kg yoğunluğunda kloramfenikol katılan 7 haftalık piliçlerin kas, karaciğer, deri ve vücut yağlarında 0.2 mg/kg, böbreklerinde de 0.6 mg/kg arasında kloramfenikol tespit edilmiştir. İçme sularına ilavesi durdurulduktan ortalama 8 saat sonra vücut yağı ve deride antibiyotik varlığı saptanmamasına karşın, aynı süre karsel kesimlerde 48 saat olarak ölçülmüştür. Kloramfenikol uygulanmasının durdurulmasından 72 saat sonra böbreklerde 0.3 mg/kg düzeyinde bulunmuştur. Burada kısaca özetlenen deneysel veriler ile, gerek sağaltım amacıyla ve gerekse katkı maddesi olarak kullanılan kloramfenikolün ihmal edilemeyecek ölçülerde hayvansal besinlere geçtiğini ve dolayısıyla da insan sağlığı açısından bakteriyel dirençliliğin oluşumu ve bu dirençli bakterilerin insanlara geçerek antibiyotiklerin insanlardaki etkilerini önemli derecelerde düşürmesi ile kronik toksisite riski yarattığı gözlenmektedir (79, 81).

DSÖ kloramfenikol kullanımının, tüm gıda değeri taşıyan hayvanlarda özellikle de, sağmal inekler ve piliç üretiminde kullanımının yasaklanmasını önermiştir (8, 92, 93). Amerika, Kanada, Avustralya ve 1994'ten bu yana da Avrupa Birliği üyesi ülkelerde gıda değeri taşıyan hayvanlarda kullanımı yasaklanmıştır (80, 81, 83, 84). Avrupa Birliği'ne Asya ülkeleri tarafından ihracı yapılan tavuk, bal ve karides gibi gıda ürünlerinde de, yasak olmasına rağmen kloramfenikol kalıntılarına rastlanmıştır (81). Avrupa Birliği içinde bazı ülkelerde de düşük hijyenik koşulların neden olabileceği olumsuz etkileri ortadan kaldırmak ve canlı büyümesini arttırmak için bilinçsizce ve yasal olmayan yollarla kloramfenikol kullanımının söz konusu olduğu ve bunun tüketiciler üzerinde kabul edilemez etkilerinin olacağı vurgulanmıştır (84, 94). Görüldüğü üzere insan sağlığı üzerinde tüm bu potansiyel zararlı etkilerine rağmen, ucuz ve etkili olmalarından dolayı hala bazı ülkelerde kullanımları serbesttir (95).

Şiddetli toksik ve yan etkilerinden dolayı Polonya'yı da içeren birçok Avrupa ülkesinde yasaklanmış olan kloramfenikolün tayini için birçok metod tanımlanmıştır. Bilinen yöntemler arasında mikrobiyolojik teknikler, biyolojik metodlar, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ve radioimmunoassay teknikleri kullanılmaktadır. Planar kromatografi, kütle spektrometresi ile kromatografi, yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC), HPLC-DAD, gaz kromatografisi (GC), kütle spektrolu gaz kromatografisi (GC-MS), GC-MS/MS, UV ile likid kromatografi, elektron tutulumlu gaz kromatografisi, LC/MS ve LC-MS/MS son yıllar içerisinde, çeşitli gıdalarda çalışılmış ve bu yöntemler geliştirilmiştir (80, 81, 96-101). LC-MS/MS de, yaygın kullanım alanı bulması, spesifikliği ve duyarlılığı ile etkili bir analiz cihazıdır. Bu tekniğin veteriner ilaçları kalıntı analizinde kullanılabilirliğini, son yıllarda yapılan birçok bilimsel çalışma ispatlamıştır (102, 103).

Bu analiz metodlarından önde geleni immunolojik bir metot olan ELISA yöntemidir. ELISA yönteminin avantajı; kullanımının kolay, sonuca ulaşmak için geçen zamanın kısa (2-2,5 saat) olması, duyarlılık ve belirliliğinin (özgüllüğünün) yüksek ve her kitle fazla sayıda numune ile çalışma olanağı sağlaması olarak belirtilmektedir (18, 100). Bugüne kadar, gıdalarda veteriner ilaçlarının ve pestisid kalıntılarının tespitinde, yüksek duyarlılık, basitlik ve küçük hacimli çok sayıda örneklerde kullanılabilmesi açısından ELISA en popüler metod haline gelmiştir (104).

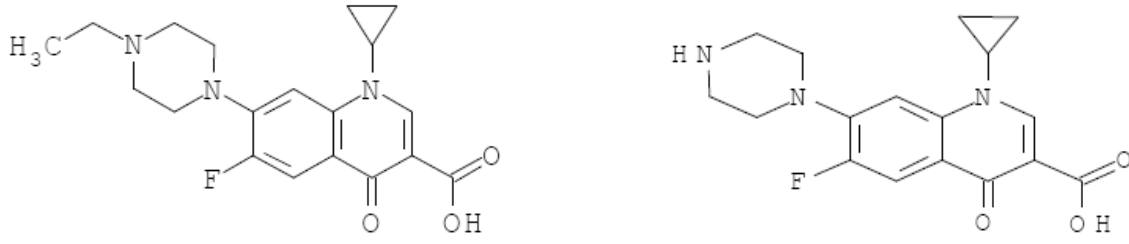
Kloramfenikol için analiz metodlarından gaz kromatografi veya HPLC gibi metodlar sayısal değerler vermekle birlikte bu metodların çok meşakkatli ekstraksiyon şekilleri vardır. Bundan dolayı, numuneleri düzenli taramak için benzeri bu metodlar pahalı ve çok fazla zaman tüketimine de sebep olduklarından çok kullanışlı metodlar değildir. Diğer taraftan ELISA metodları, kloramfenikol tespiti için basit numune ekstraksiyonuna izin veren, yapılması kolay ve kısa zamanlarda çok fazla numuneyi de bir arada işlemeye imkan sağlayan metodlardır (98).

Enrofloksasin/siprofloksasin

Antibiyotik çağının başlamasından günümüze değin bakteriyel dirençlilik olgularının giderek artma eğilimi göstermesi, daha güçlü etkinliğe ve geniş antibakteriyel spektruma sahip ajanların geliştirilmesine yönelik araştırmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu yöndeki araştırmaların bir bölümü mevcut antibiyotiklerin molekülünde değişiklikler yapılmasına yönelik olurken, önemli bir bölümü de yeni kimyasal bileşiklerin geliştirilmesini veya biyolojik kökenli antibiyotiklerin izolasyonunu amaçlamıştır. Bu kapsamda özellikle florokinolonlar olmak üzere, tüm kinolon türevi antibakteriyel ajanlar sentez yolu ile geliştirilen, enfeksiyöz hastalıkların sağaltımı amacı ile kullanılan en önemli ve dikkat çekici ilaç türleri olarak kabul edilmektedir (79).

Kinolonlar, hayvan ve insan sağlığı alanında solunum sistemi hastalıkları, üriner sistem enfeksiyonlarında ve enterik bakteri enfeksiyonlarının tedavilerinde kullanılan sentetik antibiyotiklerdir (105, 106). Gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile birçok önemli kanatlı patojenlerine, özellikle de mikoplazmaya karşı çok etkili olan geniş spektruma sahip ajanlardır (107-110). Sığır, domuz ve tavuklarda veteriner ilacı olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bu nedenlerden dolayı her geçen gün kullanımları da artmıştır (108).

Giraz inhibitörleri, biyoyararlanımları ve etki özelliklerine göre 4 alt grup altında incelenmektedir. Bu alt gruplardan birini, gıda değeri taşıyan hayvanlara uygulanması sıkça yapılan enrofloksasin (metaboliti siprofloksasin) ve danofloksasin oluşturmaktadır (108, 111). Enrofloksasin, sentetik (1 - siklopropil - 6 - floro - 1, 4 - dihidro - 4 okzo - 7 - (etil - 1 - piperazinil) - 3 - kinolon - karboksilik asit) bir florokinolondur (112, 113). Hastalıklı hayvanlarda bulunan gram negatif ve gram pozitif bakterilere ve önemli patojenik bakterilere karşı, bakterisidal aktiviteye sahip geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (42, 48, 112, 114). Enrofloksasin veteriner sağaltımında domuzlarda, sığırlarda, tavuklarda, köpek ve kedilerde kullanılır (48). Tavuk ve hindilerde, *mycoplasmosis*, *colibacillosis* ve *pastorellosis* ve özellikle de *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır (79, 113).



Şekil- 6: Enrofloksasin ve siprofloksasin'in kimyasal yapıları

Enrofloksasin; 1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4-okzo-7-(4-etil-1-piperazinil) 3-kinolin karboksilik asit (106, 115)

Siprofloksasin; 1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4-okzo-7-(1-piperazinil)-3-kinolin karboksilik asit (106, 115)

Tüm florokinolonlar oral ve paranteral doz formlarında oldukça dayanıklıdırlar. Diğer antibakteriyel ajanlar ile baskılayıcı etkileşime girmemesi nedeniyle çeşitli ilaçlarla birlikte kullanılabilirler. Kinolon türevi antibakteriyel ajanların N-1 konumunda eklentiler yapması yönünden, enrofloksasin ve danofloksasin birçok patojene karşı siprofloksasine göre daha güçlüdür. Siprofloksasin de, norfloksasine göre daha etkilidir. Enrofloksasin ve siprofloksasin diğer florokinolonlara göre daha geniş antibakteriyel spektruma sahiptirler. Bu antibiyotiklerin pastorella ve mikoplazma etkenlerine karşı etkin yarılanma ömürleri 4-6 saat arasında değişmektedir (79).

Gerek hayvan yetiştiriciliğinde ve gerekse tıp hekimliğinde söz konusu antibiyotiklerin yoğun bir şekilde kullanımı zaman içerisinde önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (48, 111).

Escherichia coli, *Shigella*, *Salmonella* suşları, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Aeromonas* spp., *Campylobacter jejuni* gibi intestinal patojen bakterilerden büyük bir çoğunluğunun yeni florokinolonlara aşırı duyarlı olduğu bir gerçektir. Son yıllarda florokinolonlara karşı duyarlı olan bu bakterilerde farklı bir mekanizma ile de dirençlilik olgularının gelişebildiği bildirilmiştir (79).

Kinolonların hayvanlarda bu kadar geniş oranlarda kullanılmaları, gıdalar aracılığıyla direkt toksik etki veya kişilerde patojenlere karşı direnç gelişimine neden olabilen kalıntı oluşumlarına neden olurlar (105). Nitekim enrofloksasinin alerjik reaksiyonlar yanında, 2000’li yılların başından itibaren kullanımına bağlı olarak bakterilerde direnç gelişimine neden olabildiği rapor edilmiştir (74, 111).

Hayvan barsak florası, bakteri çeşitliliği ve yoğunluğu nedeni ile direncin gelişmesi için ideal bir ortamdır. Çiftlik hayvanlarında enrofloksasin kullanılması, zoonotik bakterilerde siprofloksasine duyarlılığın azalmasına neden olabilir. Dirençli bakteriler hayvansal gıdalar aracılığıyla insanlara geçebilir ve böylece bu bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde siprofloksasinin etkinliği de azalabilir (116, 117). Hayvan türlerine göre değişmekle birlikte, florokinolon direncinin yaygınlığı % 5 ile % 75 arasında değişmektedir (118, 119).

Florokinolon grubu ilaçlar arasında çapraz direnç gelişimleri de rapor edilmektedir (56). Bu ajanlara karşı dünya çapında, hastaneler ve halk arası enfeksiyonlarda bakteriler arasında artan bir direnç geliştiği, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, tavuklardan insanlara geçebilen özellikle florokinolon dirençli *Campylobacter* spp. bu bakteriler olarak sayılabilmektedirler (48, 106, 112).

Direncin oluşumunda, kinolonların etki mekanizması önemlidir. Kinolonların hedef bölgesi DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimleridir. Bu enzimleri kodlayan bölgede meydana gelen mutasyonlar, direncin oluşmasından sorumludur. DNA giraz, *gyrA* ve *gyrB* alt birimlerine sahip tetrametrik bir enzimdir. Bu enzim, *gyrA* alt birimi aracılığıyla DNA molekülünün fosfat grupları ile kovalent bağ meydana getirir. Benzer şekilde iki alt birimden (ParC ve ParE) meydana gelen topoizomeraz IV de, tetrametrik bir enzimdir. Topoizomeraz IV, florokinolonların gram pozitif bakterilerde birincil, gram negatif bakterilerde ise ikincil hedef bölgesidir. Yeni kuşak florokinolonlar ikili olarak bağlandıklarından, hem DNA giraz hem de topoizomeraz IV enzimini eş zamanlı olarak inhibe eder. Böylece florokinolonlar, DNA giraz ve topoizomeraz IV’ün oluşturduğu kırılmaları durdurarak, DNA’nın sentezlenmesini baskılar (116, 120-122).

Florokinolon direncine aracılık eden mutasyonların büyük çoğunluğu kinolon direncini belirleyici bölge (Quinolone Resistance Determining Region: QRDR) olarak tanımlanan *gyrA* ve *gyrB* birimlerinde meydana gelmektedir (116, 117, 120). Topoizomerez IV'teki mutasyonlar da ParC ve ParE birimlerinde meydana gelmekte olup, yüksek etkili direncin oluşması bakımından önemlidir (120). Florokinolon direnci, DNA giraz ve topoizomerez IV mutasyonlarının yanı sıra, membran proteinlerinin yapısal değişime bağlı olarak, ilacın hücre içi birikiminin azaltılması sonucu da gelişebilmektedir (123-125). Bu yapısal değişime de *marC* ve *marRAB* adlı ayrı konumlanmış iki alt birimden oluşan *mar* bölgesi aracılık eder. *marRAB* *marR*, *marA* ve *mar B*'yi temsil eder (232). *marA*, altmıştan fazla kromozomal genin ekspresyonunu değiştiren ve tetrasiklin, kloramfenikol, ampisilin, nalidiksik asit, siprofloksasin, norfloksasin, puromisin, rifampisin ve bazı dezenfektanlara karşı direnç gelişiminden sorumlu olan bölgedir (126-129). *Mar* ekspresyonu antibiyotiklerin etkinliğini azaltarak bakterisid etkinin bakteriyostatik etkiye dönüşmesine neden olur ve Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK) yaklaşık üç kat artar (126).

Florokinolonlara dirençli *Campylobacter* enfeksiyon insidansı, enrofloksasinin kullanımı ile birlikte önemli derecelerde artmıştır (112). Florokinolon ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerin kanatlılarda yaygın bir şekilde kullanılması sonucu, bu antibiyotiklere karşı termofilik *Campylobacter* spp.'nin artan oranda direnç kazandığı gözlenmiştir. Buna bağlı olarak, kanatlı etlerinin çoklu antibiyotik direnci (Multiple Drug Resistance, MDR) gösteren enteropatojenik bakteri türlerinin insanlara geçmesinde önemli bir kaynak olduğu belirtilmiştir (47).

Kinolonların veya kinolon dirençli bakterilerin etkileri ile ilgili olarak birbirinden farklı 3 adet oluşum mekanizması üzerinde durulmaktadır. İlki; gıdalar kesim sırasında veya işlenmeleri sırasında, kinolon dirençli zoonotik patojen bakteriler tarafından kontamine olurlar. İkincisi; insanlar için patojen olmayan kinolon dirençli bakteriler hayvanlarda mevcuttur. Kontamine gıdalar insanlar tarafından tüketilip sindirildiğinde, bu bakteriler direnç özelliklerini insan barsak sistemindeki kommensal ve potansiyel patojen bakterilere aktarırlar. Üçüncüsü ise; kinolonlar gıdaların tüketiminden sonra antibiyotik dirençli bakterilerin oluşmasına uygun gıdalar içinde kalıntı olarak kalmaktadırlar (130).

Bu mevcut direnç her ne yolla kazanılmış olursa olsun, bu durum gıda kaynaklı patojen bakterilerden (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* gibi) kaynaklanan hastalıkların tedavi etkinliğini azaltacaktır. Hayvandan ve gıdalardan izole edilecek kinolon dirençli bakterilerin izlenmesi, hayvanlarda kullanılacak antibiyotiklerin bilinçli şekilde kullanılmaları ve kinolon kalıntı izleme çalışmalarının yapılması en önemli önceliklerden olmalıdır (130).

Kinolonların da gıda değeri olan hayvanlarda kullanımı, insan sağlığını yakından ilgilendiren önemli bir konudur. Çünkü bu ilaçlar birçok ciddi hastalığın sağaltımında kullanılmaktadır. Veteriner hekimler, halk sağlığı konusunun önemli bir parçası olarak, gıda değeri taşıyan hayvanlarda florokinolonlar ile gereksiz ve uygunsuz olan tedavilerden kaçınmaları gerektiğinin sorumluluğunda olmalıdırlar (106).

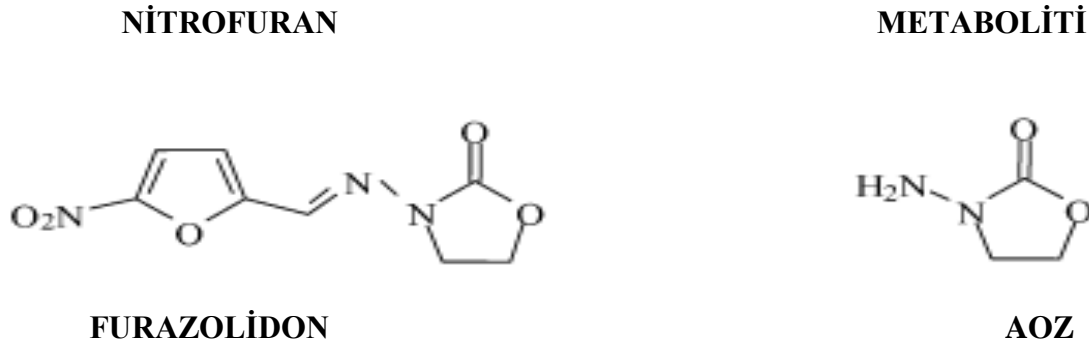
Gıda değeri taşıyan hayvanlarda kullanımı, mikrobiyal direnç gelişimi gibi önemli bir soruna yol açtığından “Council Regulation (EEC) No: 2377/90” yasasında değişime neden olmuş ve bu bağlamda bazı kinolonlar için MKL değerleri tanımlanmıştır (108). Amerika Birleşik Devletleri FAO ve Avrupa Birliği’nin yetkili idari birimleri, tüketicilerin potansiyel sağlık problemlerini önlemek için kinolonların gıdalar içerisindeki MKL’lerini belirlemiş, FDA tarafından da enrofloksasinin tavuklarda kullanımı yasaklanmıştır (106, 112, 131). Enrofloksasin ve onun metaboliti siprofloksasin için, kanatlıları da içeren farklı hayvan türlerinde et, yağ, karaciğer ve süt içindeki kalıntı limitleri EEC 1990’da yasal olarak belirlenmiştir (109). 2377/90/EEC’ ye göre kanatlı etlerinde kinolon grubundan enrofloksasin ve siprofloksasin için kasta maksimum kalıntı limitinin 100 µg/kg olması gerektiği bildirilmiştir (105, 132). Türkiye’de de kinolonlar için, gıdalarda bulunması gereken maksimum kalıntı limitleri aynı oranlarda belirlenerek, Avrupa Birliği mevzuatına uygun hale getirilmiştir (133). Veteriner İlaçları Kalıntı Limitleri Tebliği’ne göre farmakolojik etkili maddesi enrofloksasin olan ilacın aranması için belirleyici kalıntı maddesi enrofloksasin ve siprofloksasin’in toplamı olarak belirtilmektedir (131).

Mikrobiyel kalıntı testi, HPLC, HPTLC, floresans spektroskopisi, kapillar elektroforez ve ELISA kinolonların gıdalardaki kalıntılarının tespitinde kullanılan metodlar arasında yer almaktadır (106, 134-137). ELISA testi süt, sığır, domuz, koyun, tavuk, hindi, balık ve karideslerde, enrofloksasinin ve siprofloksasinin kantitatif analizi için kompetatif enzim immunoassay temeli ile yapılmaktadır (108).

Nitrofuran AOZ

Nitrofuranlar (furaltadon, nitrofurantoin, nitrofurazon ve furazolidon) sığır, domuz, tavuk, kültür balıkları ve karides üretiminde yem katkısı olarak büyümeyi destekleyici, insan ve hayvanlarda bakteriyel hastalıkların (*E. coli* ve *Salmonella* spp. kaynaklı) profilaktik ve terapötik sağaltımı ile protozoonlara bağlı gastrointestinal hastalıkların tedavisinde kullanılan, geniş spektrumlu ve sentetik antimikrobiyal ajanlardır (138-144). Etkili antibakteriyal ve farmakokinetik özelliklerinden dolayı, hayvan yetiştiriciliğinde sıklıkla kullanılmaktadır (144).

Bilimsel kaynaklarda 4 temel nitrofuran kimyasalı bildirilmektedir. Bunlar; furazolidon, furaltadon, nitrofurantoin ve nitrofurazon'dur. Bu 4 nitrofuranın, marker metabolitleri de sırasıyla 3-amino-okzazolidon (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-1,3-okzazolidin (AMOZ), 1-aminohidantoin (AHD) ve semikarbazid (SEM)'dir (143).



Şekil- 7: Nitrofuran ve metaboliti AOZ'un kimyasal yapısı (115, 141).

Nitrofuranlar stabil değildirler ve hücre içinde çabuk bir şekilde metabolize olurlar ki bu özellikleri onların yenilebilir dokular içinde kalıntı tespitlerini zorlaştırmaktadır (46, 141). Tavuk karaciğerinde postmortem devrede çok hızlı bir şekilde indirgenmektedir (145). Ana maddesinin plazma seviyeleri, çok hızlı bir şekilde düşmektedir (141).

Furazolidon [N- (5 - nitro - 2 - furfurylidin) - 3 - amino - 2 - okzazolidon] ise barsak antiseptiği olarak kullanılmaktadır (79, 146). Gram negatif basiller ve gram pozitif koklar üzerine etkili olan geniş spektrumlu bir ilaç olarak bilinmektedir (79). Bu ajan, özellikle kanatlılarda *Salmonella*'ya karşı etkilidir. Yaygın koksidiyozislerde sülfonamidlere alternatif

olarak kullanılır. *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Giardia*, *Eimeria*, *Histomonas*, *Escherichia coli* üzerine etkisi olduğundan, sindirim sistemi düzenleyicisi olarak verilir. Bakteriyel dizanteri, enterit, giardiazis, koksidiyozis ve mikoplazmaya karşı etkili olduğu da bildirilmiştir (79). Grubun diğer üyelerinden olan nitrofurazon furazolidone ile beraber nispeten ucuz olmaları, çevre şartlarına çok dayanıklı olmaları ve belirtilen özellikleri nedeniyle içme suları ve yemlere kolaylıkla karıştırılabilmekte, kanatlıların sekal koksidiyozları ve bazı bakteriyel sindirim sistemi hastalıklarının klinik ve koruyucu sağaltımında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (41).

Tüm bu olumlu etkilerinin yanında, toksik etkileri de nispeten fazladır (79). Uzun çalışmalar sonucunda, temel ilaç ve onların metabolitlerinin karsinojenik ve mutajenik özellikler gösterdiği belirlenmiştir (144). JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 1993 yılında furazolidon ve nitrofurazon'u değerlendirmeye almış ve in vitro genotoksisite testlerinde furazolidon'un pozitif etkileri olduğunu rapor etmiştir. Fare ve sıçanlarda, malign tümör oluşum insidansını artırdığından, furazolidon genotoksik bir karsinojen olarak bildirilmiştir (143).

İnsanlarda özellikle de temel maddesi ve metabolitlerinin potansiyel toksikolojik (karsinojenik ve mutajenik) tehlikesi nedeniyle, Avrupa Birliği'nde 90'ların ortalarında gıda üretimi yapılan tüm hayvanlarda yasaklanmaları söz konusuydu (139, 140, 143). Bu gelişmelerin ardından nitrofuranolardan, (furaltadon, nitrofurantoin ve nitrofurazon) 1993-1995 yıllarında Avrupa Birliği'nden Nijerya'ya kadar uzanan geniş bir coğrafyada tüketiciler için taşıdığı bu mevcut potansiyel toksikolojik etkilerinden dolayı gıda değeri taşıyan hayvanlarda kullanımı yasaklanmıştır (139, 144, 147, 148). Bunları takiben genotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkileri yüzünden 1995 yılında furazolidon da yasaklanmıştır (74, 142, 144, 146). Yine de çeşitli ülkelerde gerçekleştirilen çalışmalar; tavuk etlerinin farklı nitrofuranol metabolitleri ile kontamine olduğunu ortaya koymuştur (149).

3-amino-2-okzazolidinon (AOZ), bir metabolit olarak temel nitrofuranol maddesinin kalıntı tespitinde aranmaktadır (138). Nitrofuranol AOZ'un in-vivo yarılanma ömrü, dokunun yapısına göre 4 ile 9 gün arasında olup, kas içerisinde yüksek bir stabilite göstermektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak, bu yasaklı ilacın uygulanmasından en az birkaç hafta sonra bile ilacın kalıntısına rastlamak mümkündür. Ayrıca, karaciğer dokusunda AOZ kalıntılarını kas dokuya göre birkaç kat daha fazla süre sonunda bile belirlemek mümkündür (142).

Nitrofuran ilaçlarının kalıntı analizleri, bunların doku bağı metabolitlerinin tespitine dayalı olmalıdır. Asıl ilaçların hızlıca metabolize olmasından dolayı, bu ana ilaçlar tedavi sonrası tespit edilemezler. Doku bağı nitrofuran metabolitleri, uygulamadan çok uzun süre sonra bile tespit edilebilirler ve sonuçta bu tespit nitrofuran varlığının göstergesidir. Uygulamadan sonraki nitrofuran metabolitleri, furazolidon (metabolit: 3-amino-2-okzazolidon, AOZ), furaltadon (metabolit: 3-amino-5 morfolinometil-2-okzazolidon, AMOZ), nitrofurantoin (metabolit: 1- aminohidantoin, AHD) ve nitrofurazon (metabolit: semikarbazid, SEM)'dir (144).

Nitrofuranın dokularda tespiti için de birçok metod bildirilmiş olup, bunlardan bazıları, likit kromatografi, elektrokimyasal tespit, kolon eşleştirmeli kromatografisi (column switching chromatography), HPLC-UV 'dir (146, 148). ELISA da, yarışmacı (kompetatif enzim immunoassay) temeli ile yapılmakta olup, furazolidon'un yasal olmayan yollardan kullanımını izlemek için "Poliklonal antikor temelli indirek kompetatif ELISA" metodu doku tutulumları için geliştirilmiş bir metoddur (144, 147).

Antibiyotik Kalıntı Analiz Teknikleri

Son yıllarda, Avrupa Birliği tarafından ilaç kalıntı tarama ve doğrulamalarına ilişkin teknik kriterler getirilmiştir (83). AB'nin 2002/657 CEE kararına göre, kloramfenikol için ön gördüğü asgari gerekli performans limiti (Minimum Required Performance Limit, MRPL) 0.3 µg/kg, 2003/181/EC kararına göre de nitrofuran metabolitleri için bu limit 1 µg/kg'dır (81, 150). Bu limit, eğer bir laboratuvar, kloramfenikol veya nitrofuran kalıntısı belirlemek için yapacağı bir çalışmada bulduğu değer Avrupa Birliği içinde resmi bir değerliliğinin olmasını istiyorsa, doku içindeki kalıntıyı en az sırasıyla 0.3 µg/kg (ppb) (300 ppt) ve 1 µg/kg (ppb) oranında tespit ettiğini göstermesi gerekliliğini belirten limittir.

2002/657/EC' ye göre, yalnızca kalitatif metotlar için kesinliği hesaplamaya gerek yoktur. Kalitatif metodlar, yasaklı yani 0 tolerans düzeyi belirtilen ilaçlarda kullanılabilir. Kantitatif metodlar ise (özellikle enrofloksasin gibi), MRL (maksimum kalıntı limiti) belirlenmiş ilaçlar için gereklidir (151, 152).

Kalitatif metodlardan olan ELISA testinin temeli, antijen-antikor reaksiyonudur. Kuyucuklar anti-“aranan ilaç” antikorlarına yönelmiş antikorlar ile kaplıdır. Kuyucuklara “Aranan ilaç” standartları veya örnek ekstraktları, “Aranan ilaç” enzim-konjugatı ve anti-“Aranan ilaç” antikorları da eklenir. Serbest haldeki “Aranan ilaç” ve enzim konjugat, “Aranan ilaç” antikorlarını bağlamak için yarışır (Kompetatif-yarışmalı enzim immunoassay). Aynı zamanda, anti-“Aranan ilaç” antikorları, immobilize antikorlar tarafından bağlanır. Bağlanmayan diğer enzim konjugat daha sonra yıkama aşamasında uzaklaştırılır. Substrat/kromojen kuyucuklara eklenir ve inkubasyona bırakılır. Bağlı enzim konjugat, kromojeni mavi bir ürüne dönüştürür. Reaksiyonu durdurma solüsyonunun eklenmesi, oluşan mavi rengin sarı renge dönüşmesini sağlamaktadır. Ölçüm 450 nm’de fotometrik olarak yapılmaktadır (108, 144, 153).

Dolayısıyla bu teknik, antijen-antikor (antibody) reaksiyonunun şekillenmesi, oluşan reaksiyonun enzim-substrat ile görünür hale getirilmesi ve spektrofotometre ile okunması esasına dayanan bir tekniktir. Sağlanan absorpsiyon, örnek içindeki aranan madde oranı ile ters orantılı olarak gerçekleşmektedir (108, 144, 153).

ELISA ile gıdalarda farklı olarak aflatoksin M₁ (154), aflatoksin B1 ve T-2 toksinleri (155), okratoksin A (156), zeranol, dietilstilbestrol, klenbuterol, 17β-östradiol ve testosteron kalıntıları (157, 158), streptomisin ve sulfametazin (sulfadimidin) kalıntıları (50, 159) araştırılmıştır.

ELISA metodu, tarama için elverişli olması ile birlikte, sonuçların kütle spektrofotometrisi ile doğrulanması da gerekmektedir. Çünkü birtakım çalışmalar göstermiştir ki, tarama ve doğrulama sonuçları arasında hatalı negatif ve pozitif sonuçlar çıkabilmektedir. Avrupa’da laboratuvarlar arası yapılan bir çalışmada; çiğ sütte ELISA taramasında, ELISA test kitinin toplam yanlış pozitif oranı % 16.7 ve toplam yanlış negatif oranı % 2.2 olarak bildirilmiştir (160).

ELISA gibi tarama metodlarında, analitin miktarının doğru şekilde tespit edilmesi gerekli değildir. Doğrulamada ise amaç analit miktarının tam olarak tespitidir. Bu, validasyon çalışmalarında seçilen en küçük konsantrasyona göre yapılmaktadır (151).

Doğrulama metodunda en az aşağıdaki parametreler belirlenmelidir.

1. CC_{α}
2. CC_{β}
3. Geri Kazanım
4. Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik
5. Seçicilik / spesifiklik
6. Sağlamlık
7. Stabilité
 - Solüsyonda
 - Numunede
8. Uygulama
 - Konsantrasyon
 - Benzer maddeler/ numune şartları/ türler
 - Analistler

Kalibrasyon eğrisi metoduna göre, CC_{α} 'nın hesaplanması için en az 5 konsantrasyon seviyesi alınarak hazırlanan matriks kalibrasyon eğrileri kullanılmalıdır. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için, yüklenmiş blank (kör) materyalle çalışılır. Örnekler tam örnek hazırlama prosedürüne uygun olarak çalışılmalıdır (151).

LC-MS/MS analizinde, karar limiti (CC_{α}), bir numunenin α 'nın hata olasılığı ile uyumsuz olduğuna karar verilebilecek limit veya üstündeki limit demektir. Saptama yeteneği (CC_{β}), β hata olasılığına sahip bir numunede saptanabilecek, tanımlanabilecek ve/veya miktarı tayin edilecek maddenin en küçük içeriği demektir. İzin verilmiş bir limitin oluşturulmadığı madde durumunda, saptama yeteneği, $1-\beta$ istatistiksel kesinliği ile gerçekten bulaştırılmış numuneleri saptayabilen bir yöntemin en düşük konsantrasyonudur. Oluşturulmuş izin verilen limitteki madde durumunda bu, saptama yeteneğinin $1-\beta$ istatistiksel kesinlik ile izin verilmiş limit konsantrasyonlarını saptayabilen yöntemdeki konsantrasyon demektir (150).

İç standart (IS), tanımlanması gereken analite mümkün olduğu kadar benzeyen fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip ve her numune ile birlikte her kalibrasyon standardına eklenen numune içinde bulunmayan bir madde demektir (150).

Asgari gerekli performans limit (MRPL), en azından saptanması ve doğrulanması gereken numune içindeki bir analitin minimum içeriği demektir. İzin verilmiş bir limitin

oluşturulmadığı maddeler için, yöntemlerin analitik performansını uyumlulaştırmak için tasarlanmıştır (150).

Validasyon, inceleme yoluyla doğrulama ve belli bir amaçlı kullanımın özel gerekliliklerin yerine getirildiği konusunda etkili bulgunun sağlanması olarak tanımlanmaktadır. Yarı maksimum yükseklikteki pik genişliği, orijinal genişliğin % 90-110 aralığı içinde ve retensiyon süreleri % 5'lik bir marjın içinde eş olmalıdır (150).

Nicel Yöntemlerin Kesinliği

Bir referans veya güçlendirilmiş materyalin tekrarlanmış analizi için laboratuvarlar- arası sapma katsayısı (CV), üretilebilirlik koşulları altında, değişimin iç-laboratuvar katsayısı Horwitz denklemince hesaplanan düzeyi aşmamalıdır. Denklem aşağıda verilmiştir:

$$CV = 2 (I - 0,5 \log C)$$

Burada C, 10'nun bir gücü (üssü) olarak ifade edilmiş kitle bölümüdür. Örnekler Tablo- 4'te gösterilmiştir.

Tablo- 4: Analit kitle bölümleri aralığında nicel yöntemler için üretkenlik CV'lerine örnekler

Kitle bölümü	Üretkenlik CV'si (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1000 µg/kg	16

(*) 100 µg/kg'dan düşük kitle bölümleri için Horwitz Denklemi, kabul edilemeyecek yüksek değerler verir. Bu nedenle, 100 µg/kg'den daha düşük konsantrasyonlar için CV'ler mümkün olduğu kadar düşük olmalıdır.

Tekrar edilebilirlik koşulları altında yürütülen analizler için, laboratuvarlar-arası CV, genelde yukarıdaki değerlerin bir buçuk ve üçte ikisi arasında olur. Laboratuvar-içi üretilebilirlik koşulları altında yürütülen analizler için, laboratuvar-içi CV, üretilebilirlik CV'sinden daha büyük olmayacaktır.

Kabul edilmiş izin verilen limitteki maddeler durumunda yöntem, 0,5 x izin verilen limit konsantrasyonuna karşılık üretilebilirlik CV'sinden daha büyük olmayan laboratuvar-içi üretilebilirliği başarmalıdır.

Validasyon ayrıca Codex Alimentarius, ISO veya IUPAC (161) gibi kabul edilmiş laboratuvarlar arası çalışma yaparak veya tek laboratuvar çalışmaları veya laboratuvar içi validasyon gibi (162, 163) alternatif yöntemler kullanılarak yapılabilir.

Kullanılan validasyon yönteminden bağımsız olarak bir dizi genel performans özelliği ve Tablo- 5’de belirtilen daha özel modellere bağımlı prosedürler söz konusudur.

Tablo- 5: Modelden bağımsız ve modele bağımlı validasyon performans parametreleri (150)

Modelden bağımsız performans parametreleri	Modele bağımlı performans parametreleri	
Genel performans özellikleri	Geleneksel validasyon yaklaşımı	Dahili validasyon yaklaşımı
Spesifiklik	Geri sağlama	Geri sağlama
Gerçeklik	Tekrarlanabilirlik	Tekrarlanabilirlik
Pürüzlülük: küçük değişiklikler	Laboratuvar içi üretilebilirlik	Laboratuvar içi üretilebilirlik
Stabilite	Üretilebilirlik	Üretilebilirlik
	Karar limiti ($CC\alpha$)	Karar limiti ($CC\alpha$)
	Saptama yeteneği ($CC\beta$)	Saptama yeteneği ($CC\beta$)
	Kalibrasyon eğrileri	Kalibrasyon eğrisi
	Pürüzlülük: büyük değişiklikler	Pürüzlülük

Kalibrasyon Eğrileri

Kalibrasyon eğrileri, miktar tayin etme için kullanıldığında:

- Eğrinin oluşturulmasında en az beş seviye (sıfır dahil) kullanılmalıdır,
- Eğrinin çalışma aralığı açıklanmalıdır,
- Eğrinin matematiksel formülü ve verinin eğriye uyumluluğu açıklanmalıdır,
- Eğrinin parametreleri için kabul edilebilirlik aralıkları açıklanmalıdır.

Standart çözeltiye dayalı ardışık kalibrasyon gerekli olduğunda, kabul edilebilir aralıklar, dizilere göre değişiklik gösterebilen kalibrasyon eğrisinin parametreleri için belirtilmelidir (150).

Karar Limiti ($CC\alpha$)

(1) Verim: Son ekstrede mevcut olan, numunede içerilen analitin kitle bölümü.

(2) Geri kazanım: Son ekstrede mevcut olan, numuneye eklenen analitin kitle bölümüdür. Verim ve geri kazanımın eşit oldukları varsayılmaktadır ve bu nedenle yalnızca 'geri kazanım' teriminin kullanılması yeterlidir.

İzin verilen limitin oluşturulmadığı maddeler durumunda $CC\alpha$, aşağıdaki biçimde oluşturulabilir:

a) ISO 11843 (164)'ye göre kalibrasyon eğrisi prosedürüyle, eşit uzaklıktaki adımlarda minimum gerekli performans seviyesinde veya üstünde güçlendirilen boş materyal kullanılmalıdır. Numuneler analiz edilir ve tanımlamadan sonra, sinyali eklenen konsantrasyona karşı grafiği çıkartılır. y-kesişimindeki uygun konsantrasyon artı kesişimin laboratuvar-içi üretilebilirliğin standart sapmasının 2.33 katı, karar limitine eşittir. Bu, yalnızca niceliksel deneyler için geçerlidir ($\alpha = \% 1$).

b) Matriks başına en az 20 boş materyal analiz ederek, analitin beklendiği zaman penceresindeki sinyal-ses orantısı hesaplanabilir. Sinyal-ses orantısının üç katı, karar limit olarak kullanılabilir. Bu, niceliksel ve niteliksel deneyler için de geçerlidir.

Oluşturulan izin verilen bir limitli maddeler durumunda, $CC\alpha$ aşağıdaki biçimde oluşturulabilir:

a) ISO 11843 (164)'ye göre kalibrasyon eğrisi prosedürüyle, yaklaşık eşit aralıklı adımlarda izin verilen limitte güçlendirilen boş materyal kullanılmalıdır. Numuneler analiz edilir ve tanımlamadan sonra, sinyali eklenen konsantrasyona karşı grafiği çıkartılır. İzin verilen limitte karşılık gelen konsantrasyon artı laboratuvar-içi üretilebilirliğin standart sapmasının 1.64 katı, karar limitine eşittir ($\alpha = \% 5$).

b) İzin verilen limitte analit(ler)le güçlendirilen matriks başına en az 20 boş materyali analiz edilir. İzin verilen limitteki konsantrasyon artı karşılık gelen standart sapmanın 1.64 katı, karar limitine eşittir ($\alpha = \% 5$) (150).

Saptama Yeteneği ($CC\beta$)

Saptama yeteneği, tanımlandığı gibi eleme, tanımlama veya tanımlama artı miktar tayin etme gerekliliklerine göre belirlenmelidir. İzin verilen limitin oluşturulmadığı maddeler durumunda $CC\beta$, aşağıdaki biçimde oluşturulabilir:

a) ISO 11843 (164)'ye göre kalibrasyon eğrisi prosedürüyle, eşit uzaklıktaki adımlarda minimum gerekli performans seviyesinde veya altında güçlendirilen temsili boş materyal kullanılmalıdır. Numuneler analiz edilir ve tanımlamadan sonra, sinyali eklenen konsantrasyona karşı grafiği çıkartılır. Karar limitindeki karşılık gelen konsantrasyon artı karar limitinde ortalama ölçülen içeriğin laboratuvar-içi üretilebilirliğin standart sapmasının 1.64 katı, saptama yeteneğine ($\beta = \% 5$) eşittir, karar limitinde analit(ler)le güçlendirilen matriks başına en az 20 boş materyali analiz edilir. Numuneler analiz edilir ve analitler tanımlanır. Karar limitinin değeri artı ölçülen içeriğin laboratuvar-içi üretilebilirliğinin standart sapmasının 1.64 katı, saptama yeteneğine eşittir ($\beta = \% 5$).

b) Niceliksel sonuçların bulunmadığı yerde, saptama yeteneği, karar limitinde ve üstündeki güçlendirilmiş boş materyalin araştırılmasıyla belirlenebilir. Bu durumda, yalnızca $> \% 5$ hata uyumlu sonuçların kaldığı konsantrasyon seviyesi, yöntemin saptama yeteneğine eşittir. Bu nedenle, bu belirlenim için güvenilir bir baz sağlamak için en az bir konsantrasyon

seviyesi için en az 20 araştırma yapılmalıdır. İzin verilen limitin oluşturulduğu maddeler durumunda $CC\beta$, aşağıdaki biçimde oluşturulabilir:

a) ISO 11843 (164)'ye göre kalibrasyon eğrisi prosedürüyle (burada net durum değişkeninin minimum saptanabilir değeri olarak değinilmektedir). Bu durumda, yaklaşık eşit aralıklı adımlarda izin verilen limitte güçlendirilen temsili boş materyal kullanılmalıdır. Numuneler analiz edilir ve analit(ler)i tanımlar. Saptama limitinde ortalama ölçülen içeriğin standart sapması hesaplanır. Karar limitinin değerindeki karşılık gelen konsantrasyon artı laboratuvar-içi üretilebilirliğin standart sapmasının 1.64 katı, saptama yeteneğine eşittir ($\beta = \% 5$).

b) Karar limitinde analit(ler)le güçlendirilen matriks başına en az 20 boş materyal analiz edilir. Karar limitinin değeri artı karşılık gelen standart sapmanın 1.64 katı, saptama yeteneğine eşittir ($\beta = \% 5$) (150).

Gıdalara Uygulanan Bazı İşlemlerin Antibiyotik Kalıntıları Üzerine Etkileri

Gıdalarda tolerans düzeyinin üzerinde bulunan ilaç kalıntıları insan sağlığı açısından tehlikeli olup, böyle gıdaların tüketilmemesi gerekmektedir. Gıdalarda ilaç kalıntılarına ilişkin mevzuatta, tolerans düzeyleri çığ dokulardaki düzeyleri göstermektedir. Bununla birlikte et, süt ve yumurta gibi hayvansal gıdalar genellikle değişik pişirme işlemleri uygulandıktan sonra tüketilmektedir. Çeşitli araştırmacılar tarafından, başta antibiyotikler olmak üzere, bazı ilaç kalıntılarının farklı pişirme işlemleri ve depolama koşullarında yıkımlanarak etkisiz metabolitlerine dönüşebildiği bildirilmiştir (47).

Hayvansal besinlerdeki ilaç kalıntıları pişirme, kavurma, kızartma, soğukta saklama gibi işlemler sırasında parçalanarak veya etkisiz metabolitlere çevrilerek zararsız hale getirilebilirler. Aminoglikozidler, tetrasiklinler ve makrolidler dayanıklı ajanlar olup, kesilmiş hayvan et ve dokularında daha uzun süre kalırlar. Genel olarak, antibiyotiklerin kaslardaki kalıntıları böbreklerdeki göre daha dayanıklıdır. Ancak, aminoglikozidler ve oksitetrasiklinin böbrekteki kalıntıları daha dayanıklı olup; bu durum böbrekteki hücrelerin bazı kısımlarına (aminoglikozidlerin fosfoinozitola bağlanması gibi) güçlü bir şekilde bağlanmalarından ileri gelmektedir (30).

Baydan ve ark. (165), etlik piliçlerin dokularındaki florokinolon grubu ilaçlardan enrofloksasin kalıntıları üzerine çeşitli pişirme işlemleri (ızgara, tuzlu ve tuzsuz haşlama) ile -18°C 'de farklı sürelerde (5, 20 ve 30 gün) muhafazanın etkisini araştırmışlardır. Izgara işleminin ilaç kalıntısının azalması yönünde olumlu bir etkiye neden olmadığı, haşlama işlemi ile ise dokudan suya geçiş şeklinde bir değişikliğin bulunduğu bildirilmiştir. -18°C 'de 5, 20 ve 30 gün muhafaza sonucu, kalıntı düzeyinin göğüs dokusunda sırasıyla % 20, % 65 ve % 78; but dokusunda % 7, % 53.5, % 78.5; karaciğer dokusunda % 8.6, % 47 ve % 84 oranında bir azalma gösterdiği saptanmıştır.

Kloramfenikolün ısı işlemine karşı duyarlı bir ilaç olduğu ve pişirme işlemleri sırasında uygulanan sıcaklık derecesinin artmasına paralel olarak kalıntı kaybının da artacağı bildirilmiştir (166). Kızartma ve kavurma işlemleri söz konusu ilaç üzerinde % 50 oranında bir azalmaya neden olurken, konserveleme işlemi kalıntıların büyük ölçüde parçalanmasına sebep olmaktadır. Derin dondurucuda (-20°C) 3 ay süre ile depolama sırasında önemli bir azalma oluşmadığı, yine sütte 2 saat ısıtma ile ancak % 10'luk bir kaybın görüldüğü rapor edilmiştir (30).

Yapılan çalışmalarda, gıdaların hazırlanması, pişirme, fırınlama ve mikrodalga gibi işlemler sırasında nitrofuranın doku bağlı kalıntı miktarlarının sabit kaldığı ortaya konmuştur (141).

İlaç Kalıntılarının İzlenmesi, Önlenmesi ve Risklerinin Ortadan Kaldırılması

Besinlerdeki ilaç kalıntılarına karşı tüketici sağlığının etkin biçimde korunabilmesi için, her çeşit hayvansal besinde bulunacak ilaç kalıntısı çeşitleri ve kirlenme düzeylerinin sınırlandırılması da son derece önem taşır. Bu sebeple, bilimsel ve yasal denetime temel oluşturacak şekilde, hayvanlarda çeşitli amaçlarla (sağaltıcı, koruyucu, gelişmeyi hızlandırıcı gibi) kullanılmasına izin verilen her veteriner hekimliği ilacı için;

- Hayvanlara uygulanacak en yüksek dozları,
- Sağaltım süreleri,
- Su veya yemlere katılan en yüksek miktarları,

- İlaç 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,
- Çoğu deney sistemlerindeki etkisiz miktarlarının belirlenmesi ve bilinmesi gerekmektedir (30).

Hayvansal kaynaklı besinlerde veteriner hekimliği ilaçlarından ileri gelebilecek kalıntıların önlenmesi;

- Hayvan yetiştiricisi veya bakıcısı,
- Reçeteyi düzenleyen veya sağaltımı yapan hekim,
- İlgili ilaç ve gıda sanayi ile
- Denetimle görevli kamu kuruluşlarının ortaklaşa sorumluluğunda olan bir görevdir.

Veteriner ilaçlarının gıda üretimi yapılan hayvanlarda ve tavuklarda kullanılabilmesi için şu kriterleri karşılaması gerekmektedir;

- a- Tavsiye edilen kullanım amacında, tavsiye edilen kullanım dozajında etkili olmalıdır,
- b- İlaç veya kimyasal, yenilebilir dokularda insan sağlığına zararlı olabileceği belirlenmiş seviyelerde kalıntı yaratmamalıdır,
- c- İlaçların kullanımı, yem hazırlanması veya hayvanların yetiştirilmesinde gerçekten etkili olacağı biliniyorsa gerçekleştirilmelidir,
- d- Kimyasal yapının tolerans limitlerinde mi yoksa altında mı olduğunu gösterir bir analitik tespit metodu olmalıdır,
- e- İlaç ve kimyasalların parçalanması ile oluşan yapılar, çevreyi ve gıdaları kirletmemelidir (54).

Veteriner hekimin, sağaltımda kullandığı ilacın besinlere geçen kalıntılarıyla insan sağlığına yönelik sakıncaları bilmesi yanında, hayvan sahibi veya yetiştiriciyi eğitmesi ve uyarması da gerekir. Ayrıca, ilaç verilmiş hayvanların besin üretiminde kullanılma durumunu da, konuyla ilgili kanun, yönetmelik, tüzük vb düzenlemelere uygunluğu yönünden sürekli izleme yükümlülüğündedir (30). Tedavi yapılacağı zaman mutlaka mikrobiyolojik testlerle hangi ilacın kullanılması gerektiği belirlenmeli, daha sonra ilaç uygulanmalıdır (42).

Antibiyotik kullanımlarının ve dolayısıyla oluşan yan etkilerinin önüne geçmek için önemli bir alternatif yol, hastalık kontrolünde veteriner hekimlerin biyolojik seçenek olan aşı kullanmalarıdır. Sahada görevli klinisyen veteriner hekimler, sağlık planları içinde bu durumu hastalıklar oluşmadan çok önce, bölge hastalıklarını veya riskleri tanımlayarak değerlendirmelidirler (38).

Ticaret ahlakı ve toplumsal değerler yönünden hayvan yetiştiricileri ve besin maddesi üreticileri ve/veya hazırlayıcıları, insan sağlığı üzerinde tehlikeli olmayacak besin maddelerini üretmek zorunda olduklarının bilincinde olmalıdırlar. Kalıntıya yol açan en önemli sebeplerden birisi olan kesim öncesi bekletme süresine uyulmamasının, özellikle hayvan sahipleri veya bakıcılar tarafından yapılan ilaç uygulamalarından ileri geldiği unutulmamalıdır (30).

Besinlerde bulunabilecek kalıntılar yüzünden insan sağlığı üzerinde sakıncalı olabilecek ilaç çeşitlerini üreten veya hazırlayan firmalar uygulama kılavuzlarında bu ilaçların yararlı etkileri yanında, bilinçsizce kullanılmaları halinde yol açabilecekleri sakıncaları da belirtmelidirler. Firmalar ilaçların dağıtım ve satış kanallarına uymalı, tanıtım broşürleri ve toplantılarında meslek ahlakı ilkelerini ihlal etmemelidirler (30).

Kamu, tüketiciler için halk sağlığı ve gıda güvenliğinin tam güvencesi olmalıdır. İlgili kurum, ilaçların etkinliği ve güvenli kullanımı yanında, gıda güvenliği bakımından gerekli, kalıntıları izleme programları da dahil, kalıntıya yol açabilecek tüm uygulamalar ve uygulama hatalarının tespit edilmesi ve giderilmesi, konuyla doğrudan veya dolaylı olarak ilgili kişilerin/kurumların bilgilendirilmesiyle ilgili politikaları belirlemeli ve uygulamaya koymalıdır. Bunun için öncelikle gıdalar içerisindeki ilaç kalıntı takibini de içeren Ulusal Gıda Güvenliği Stratejik Planı hazırlamalıdır (30).

- Plan tüm gıda maddelerini, hayvanlarda kullanılan ve kullanılma ihtimali bulunan ilaçları/maddeleri kapsamalıdır,
- Her gıda maddesi, canlı hayvan, yem maddesi için program hedefleri (örnek sayısı, aranacak madde olarak) gerçekleştirilmelidir,
- Planın aksamasına izin vermeyecek şekilde bütçesi ayrılmalıdır,
- Kalıntı ve/veya gıda maddelerinin çiftlikten sofraya kadar izlenmesini sağlayacak şekilde planlanmalı ve yürütülmelidir,

Kamu tarafından ayrıca;

• Kasaplık hayvanlarda ilaçların vücuttan arınma (kesim öncesi bekletme) süreleri (hayvan türü, farmasötik şekil, uygulama yolu) dikkate alınarak, süt, yumurta ve bal gibi gıdaların tüketilmeme süreleri belirlenmelidir.

• Kasaplık ve gıda değeri olan hayvanlarda kullanılması tehlikeli ve yasak ilaçlar/maddeler listeleri;

o Et hayvanları,

o Sağılan hayvanlar,

o Yumurtacı kanatlılar,

o Arılar,

o Su hayvanlarını kapsayacak şekilde belirlenip yayınlanmalıdır,

• Yasaklanan ilaçların kullanılması engellenmelidir,

• Hayvan türleri ve gıda maddelerine göre aranacak olanlar yanında, ruhsatsız-yasak olanlar da devamlı kontrol edilmeli ve izlenmelidir,

• Bazı ilaçların veya ilaç gruplarının imalat-tüketim zinciri arasında tümüyle kontrollü kullanımı sağlanmalıdır,

• İlaçların etiket/prospektüslerinde istenilen bilgiler bulunmalıdır,

• Veteriner hekimlerin sağaltımda veya diğer amaçlarla kullandıkları ilaçları ve hayvanların kayıtlarını tutmasını sağlamalıdır,

• Çiftlik seviyesinde hayvanlarda kullanılan ilaç kayıtlarının tutulmasını sağlamalıdır,

• İlaçların imalat-dağıtım-satış kanallarında etkin bir şekilde kontrolü yapılmalıdır,

• Türk gıda kodeksi yönetmeliği (TGKY) ve bu yönetmeliğe göre hazırlanan listeler, tebliğler devamlı gözden geçirilmeli ve güncelleştirilmelidir,

• Veteriner hekimler için sürekli-eğitim programları düzenlenmelidir; bu programlar;

o Klinik yapan veteriner hekimleri (özellikle ilaç kalıntılarının sebepleri, önlenmesi, temel bilgiler, mevzuat gibi konular),

o Kontrolde görevli veteriner hekimleri,

o Özel sektörde çalışan veteriner hekimleri kapsamalıdır (30).

Kalıntılara İlişkin Yasal Düzenlemeler ve Uygulanan Sistemler

İlaç kalıntılarının yol açabilecekleri ekonomik kayıpların önlenmesi ve tüketici sağlığının korunması için, DSÖ, Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Gıdalardaki Veteriner İlaçları Kalıntıları Kodeks Alimentaryus Komitesi (CRVDF), Avrupa Birliği'nin diğer ilgili birimleri ile ülkemizde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Sağlık Bakanlığı gibi önemli kamu kurumları tarafından sürdürülen çalışma ve uygulamalar arasında birlik ve uyum sağlanmaktadır (47, 167, 168). Birçok ilacın bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı limitleri AB mevzuatı ile uyumlu olarak, Türk Gıda Kodeksi kapsamında 28.04.2002 tarih ve 247739 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan tebliğ ile düzenlenmiştir. 19.01.2005 tarih ve 25705 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan "Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik" esaslarına göre ülkesel kalıntı izleme planı uygulanmaktadır. Hayvan türü veya gıda çeşidine göre aranacak maddeler ve incelenecek örnek sayısı, 96/23/EC sayılı AB direktifi ile uyumlu olarak hazırlanarak, Bakanlık tarafından Ankara ve İzmir İl Kontrol Laboratuvarları ile Etlik, Bornova ve Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüleri kalıntı izlemede yetkili kılınmıştır (47).

Bilinçsizce antibiyotik kullanımının ve üretimde yol açtığı zararların önlenebilmesi amacıyla DSÖ, FAO ve JECFA (Gıda Katkı Maddeleri Düzenlemeleri Birleşik Komitesi) tarafından yapılan çalışmalarda, değişik yöntemler uygulanarak, her bir ilaç için belirtilen MKL ve yasal bekletme süreleri tespit edilmiştir (53, 169).

Amerika'da tavuk ve kırmızı etlerde gıda güvenliğini sağlamak açısından, kalıntı takibini yasal olarak yürüten FDA, Amerika Gıda Güvenliği ve İzleme Servisi (FSIS) ve Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA), yetkilendirilmiş ve çalışmaları yürütmektedirler (44, 54). Bu kuruluşlar, kendi içlerinde yaptıkları görev dağılımıyla, insan sağlığına zararlı olan etken maddeleri belirleyerek kullanımının yasaklanmasını, kullanılmasına izin verilen ilaçların, gıdalar içinde bulunması gereken MKL oranlarını belirlemekle, yem ve gıdalarda bu kalıntıları izlemekle görevlidirler (54). MKL sınırları, ADI (mevcut ilacın günlük kabul edilebilir alımı)'ya göre hesaplanmaktadır (169).

Avrupa Birliği bazı veteriner ilaçlarının kullanımında, gıda üretiminde kullanılan hayvanlar için ciddi düzenlemeler getirmiş ve bazılarının yalnızca terapötik amaçlı kullanımına izin vermiş olup, 1990-1998 yıllarından bu yana insan tedavisinde kullanılan antibiyotik kökenli büyüme faktörlerinin kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde yemlere katılmasını yasaklamıştır (4, 32, 47). Avrupa'nın yeni Yem Katkıları Yasası'nda da (1831/2003/EC) antibiyotiklerin tümünün büyüme arttırıcı olarak kullanımının yasaklanması kararı alınmıştır (6).

Çoğu ülkelerde, farmakolojik etkili maddelerin kullanımı ile ilgili, kesilecek kasaplık hayvanlara 5 gün önce antibiyotik ve benzeri ilaçlar verilemeyeceği ve antibiyotik tedavisine maruz kalmış hayvanların sütlerinin de bu süre içinde tüketilemeyeceğine dair yönetmelikler bulunmaktadır (45).

İstenmeyen bu etkilerden kaçınmak için, besinlerdeki ilaç ve kimyasal madde kalıntılarını ve düzeylerini ortaya koyan son derece duyarlı (ppb ve hatta ppt düzeyinde bile ölçüm yapabilen), güvenilir ve tekrarlanabilir analiz yöntemleri geliştirilmiş, WHO, FAO, Avrupa Birliği'nin ilgili birimleri ve FDA gibi kuruluşlar ile ülkemizde Tarım ve Sağlık Bakanlığı gibi önemli kamu kurumlarınca, tüketici sağlığının korunması da dahil, ilaç kalıntılarının yol açabilecekleri ekonomik ve sosyal yönlü olumsuzlukların önlenmesi için bir yandan veteriner hekimliği ilaçlarının kullanımı alanında etkin bir kontrolün sağlanması hedeflenirken, bir yandan da tüm ülkelerde aynı konularda sürdürülen çalışma ve uygulamalar arasında birlik ve uyum sağlanmaktadır (30).

Kullanılan bu antibiyotikler, özellikle de toplu tüketim yerleri de olmak üzere, kurulan ISO 22000 gıda güvenliği yönetim sistemleri çerçevesinde potansiyel (olması muhtemel) kimyasal tehlike olarak HACCP planlarında yer almakta, üretim hattına girişten önce ve mal kabulü sırasında tedarikçi firmalardan kalıntılar ile ilgili analiz sonuçlarının istenmesi veya gerekli analizin belirli zamanlarda yapılması gerekliliği de vurgulanmaktadır (170). Kanatlı etlerinin ilaçlar ile kontaminasyonlarının takibi, kullanımına izin verilmiş bileşiklerin kullanımının hatalı bir şekilde yapılmadığını ve tüketiciler için tehlikeli olmayacağını anlaşılması için de gerekli olan bir düzenlemedir (54).

Türkiye'de Mevcut Risk Durumu

Ülkemiz, hayvansal gıda teminini entansif hayvancılıktan sağlamaktadır. Entansif hayvancılıkla uğraşan üreticimiz kısa zamanda yüksek verim elde etmek istemektedir. Üreticimizin yüksek verim elde etmek için; hormon, ilaç ve büyütme faktörü olarak kullanılan antibiyotikler için belirlenen yasal zorunluluklara uyup uymadıkları tam olarak denetlenmemektedir (34).

Belli bilimsel ve mevzuat esaslarına göre, gerektiği zaman kullanılması gereken veteriner hekimliği ilaçlarının ülkemizde çoğunlukla geliş güzel kullanıldığı bilinmektedir. Bugün için ülkemizde, antibiyotikler ve antihelmentikler başta olmak üzere, veteriner hekimliği ilaçları hiç bir denetim söz konusu olmaksızın hayvan sahipleri, hayvan bakıcıları veya yetiştiricilerince rastgele sağlanarak suistimal derecesinde tüketilmektedir (30).

Türkiye'de, veteriner hekimliğinde antibakteriyel ilaçların tedavi edici ve koruyucu amaçla kullanımı yaygındır. Tedavi edici amaçla çiftlik hayvanlarında, koruyucu amaçla da kanatlı sektöründe kullanımı daha fazladır. Besi hayvanlarında antibakteriyel ilaç kullanımı sınırlandırılmış ve kesim öncesi bekleme süresi belirlenmiştir. Ancak, Türkiye'de besi hayvanlarında bu ilaçların tedavi edici amaçla kullanımından sonra kesim öncesi bekleme süresine dikkat edilmeden veya ölüm riski var ise hayvanlar kesime gönderilebilmektedir. İlaç kalıntılarının kontrolü amacıyla kesimhanelerde rutin ve yeterli bir denetim mekanizması bulunmamaktadır. Son yıllarda askeri birlikler satın aldıkları etlerin bazı antibakteriyel ilaçlar açısından kontrolünü yaptırmaya başlamışlardır, ancak özel sektörde ve diğer kamu kuruluşlarında bu konuda yeterli bir çalışma bulunmamaktadır (50).

Veteriner hekimliği ilaçlarında ruhsatlandırılma işleminden sonra, bugüne kadar hiç bir şekilde piyasa kontrolü söz konusu olmamıştır. Bu durum hayvan yetiştiricilerinin sürekli olarak aldatılmasına, ilaçtan beklenen yararın sağlanamamasına ve kalitesiz ilaç veya ilaç hammaddeleriyle hayvan ve insan sağlığının tehlikeye sokulmasına yol açmaktadır (30).

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 2009 yılı Ekim ayı içinde yayımladığı bir genelge ile, yukarıda anlatılanları bir nevi özetleyerek, ülkeye "kaçak yollarla" antibiyotik getirildiğini belirtmektedir. Alınan önlemlere ve yapılan düzenlemelere karşı zaman zaman kaçak yollarla özellikle antibiyotik getirildiği, bu ürünlerin "sarı toz" veya "altın toz" ismiyle "verimlilik

artışı ve hastalıklardan koruma" amacıyla pazarlandığı, aynı şekilde ilaç üretimi için yasal yollarla ithal edilen bazı ham maddelerin gümrük işlemleri tamamlandıktan sonra fiçı ve torbalarla tavuk, balık, büyükbaş ve küçükbaş hayvan çiftliklerine yasalara aykırı olarak pazarlandığı duyuları alındığına işaret edilen genelgede, denetimlerin arttırılması gerekliliği de vurgulanmaktadır (171).

Genelgede, sürekli antibiyotik kullanımının mikroorganizmalara karşı direnç yarattığına, ayrıca hayvansal gıdalarda kalıntı oluşturduğuna ve hatta insan hekimliğinde de patojen mikroorganizmalara karşı direnç geliştiğine dikkat çekilmektedir (171).

Antibiyotik direnci hem Avrupa'da hem de yurdumuzda halk sağlığı tehdidi haline almıştır. Örneğin Türkiye'de *E. coli*'nin gösterdiği 3. kuşak sefalosporin direnci 2003 yılında % 25.6 iken 2008 yılında % 41.6'ya yükselmiştir. Avrupa ülkelerinin önemli bir bölümünde metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) oranları % 25'den fazla iken, Türkiye'de % 37 'dir. Eğer bu sorun ciddiye alınmaz ve antibiyotik kullanım hızı aynı şekilde devam ederse, direnç nedeniyle antibiyotik öncesi çağa dönülmek durumunda kalınacak ve basit bir enfeksiyon dahi öldürücü olabilecektir (172).

Ülkemizde kullanılan, karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etkileri olan nitrofuran, lökopeni ve aplastik anemiye neden olan kloramfenikol gibi veteriner ilaçlarının Avrupa Birliği'ne uyum çerçevesinde gıdalardaki en fazla kalıntı limitleri sıfır olarak belirlenmiştir (133, 173, 174, 175). Kloramfenikol ve furazolidon da dahil olmak üzere, nitrofuranların insan gıdası elde edilebilen hayvanlara uygulanması yasaklanmış, bu maddeleri içeren ve gıda değeri olan hayvanlarda kullanılmaya mahsus olan veteriner ve tıbbi ilaç ve ürünlerin daha önceden verilmiş olan ruhsatları da iptal edilmiştir. Bu farmakotoksikolojik etkili maddeleri ya da bunları içeren ürünleri gıda değeri olan hayvanlara uygulamak, uygulanmasına izin vermek, gıda değeri olan hayvanların yetiştirildiği çiftliklerde bulundurmak, ilgili bakanlıkların izni olmaksızın bu maddeleri imal veya ithal etmek, dağıtmak veya satmak, ayrıca bu konuda araştırma veya denetim yapan ilgili kamu personelini engellemek yasaklanmıştır (176).

İnsan ve hayvan sağlığı ile çevresel etkileri yönünden son derece etkin olan veteriner hekimliği ilaçlarından reçeteyi gerektirenlerin mutlaka veteriner hekim reçetesi karşılığında eczanelerden veya doğrudan veteriner hekimlerden sağlanması gerekirken, bugün bu duruma büyük ölçüde uyulmamaktadır. Tüm bu olumsuz durumlar ve sakıncalı uygulamalar yanında, yetiştiricinin gerek hayvan yetiştiriciliği, gerekse böyle ilaçlara ilişkin yeterli bilgiye sahip olmaması da bu tür ilaçların yüksek ölçülerde ve yanlış bir şekilde kullanılmasına sebep olmaktadır (30).

Ülkemizde halen beyaz et, su hayvanları, süt ve balda yıllık olarak lkesel Kalıntı İzleme Planı yapılmakta ve uygulanmaktadır. Kalıntı izlemede, Bakanlık tarafından Ankara ve İzmir il Kontrol Laboratuvarları ile Etlik, Bornova ve Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlükleri yetkili kılınmıştır (30).

Her yılın 18 Kasım günü, “Avrupa Antibiyotik Farkındalık Günü” olarak bilinmektedir. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı’ndan yapılan yazılı açıklamaya göre, antibiyotik direncinin alarm verecek hızda arttığı vurgulanarak, halk sağlığı için ciddi risk olan bu durumdan bahsedilmektedir. Avrupa Hastalıkların nlenmesi ve Kontrol Merkezi (ECDC) Avrupa Birliği ye ve aday ülkelerle birlikte, 18 Kasım’ı “Avrupa Antibiyotik Farkındalık Günü” olarak ilan etmiştir. Avrupa Antibiyotik Farkındalık Günü’nn amacı, antibiyotik direnci problemine karşı farkındalık yaratmak ve antibiyotiklerin gelecekte de etkili olabilmesi için herkesin katılımının nasıl sağlanacağı hakkında bilgi vermektir (33).

Özellikle besin değerisi olanlar hayvanlarda olmak üzere, tüm hayvanlarda ilaç kullanımı söz konusu olduğu sürece, bunlardan sağlanan et, süt, yumurta, bal gibi besinlerde ilaç kalıntılarının bulunması güncelliğini koruyacaktır. Bu durumda, veteriner hekimliği ilaçlarının hayvanlarda bilinçli ve kontrollü kullanımı sağlanarak, hayvansal kaynaklı besin maddelerinin ilaç kalıntılarıyla kirlenme tehlikesi ve boyutu en aza indirilebilir (172).

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Tavuk Eti ve Karaciğeri Örnekleri

2008 Aralık ile 2009 Ağustos tarihleri arasında Bursa'da çeşitli market ve kasap dükkanlarında taze olarak satışa sunulan, 90 adet tavuk göğüs eti ve 90 adet but eti ile 90 adet tavuk karaciğeri örneği ambalajları içinde satın alındı ve soğuk zincir altında analize alınmak üzere laboratuvara getirildi.

Çalışmada T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Bursa Gıda Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü ve İstanbul Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nün aşağıda belirtilen kimyasal ve çözelti ile alet/donatı olanaklarından yararlandı.

Kimyasallar ve Çözeltiler

ELISA Analizi

Enrofloksasin/siprofloksasin

Distile Su (GFL 2108)

% 70'lik metanol (Merck)

PBS-Tween buffer (%0.05 tween 20 içeren 10 mM fosfat buffer, pH 7.4) (r-biopharm)

0 µg/kg (negatif kontrol), 1 µg/kg, 3 µg/kg, 9 µg/kg, 27 µg/kg, 81 µg/kg'lık metanolik çözelti içinde enrofloksasin/siprofloksasin standart solüsyonlar (r-biopharm)

Siprofloksasin bağlı peroksidaz (Konjugat) (r-biopharm)

Anti-siprofloksasin antikoru (r-biopharm)

Substrat/kromojen (tetrametilbenzidin içeren) (r-biopharm)

1 N H₂SO₄ (r-biopharm)

Stok solüsyonu (r-biopharm)

Kloramfenikol

Distile Su (GFL 2108)

Etil asetat (Merck)

n-hekzan (Merck)

Buffer (r-biopharm)

PBS-Tween buffer (% 0.05 tween 20 içeren 10 mM fosfat buffer, pH 7.4) (r-biopharm)

0 ng/kg (negatif kontrol), 25 ng/kg, 50 ng/kg, 100 ng/kg, 250 ng/kg, 750 ng/kg'lık kloramfenikol standart solüsyonlar (r-biopharm)

Enzim konjugat (r-biopharm)

Substrat/kromojen (r-biopharm)

1 N H₂SO₄ (r-biopharm)

Stok solüsyonu (r-biopharm)

Nitrofuran, Furazolidon AOZ

Distile su (GFL 2108)

1 M HCl (Merck)

Dimetil süfoksit (Merck)

10 mM 2-nitrobenzoik aldehit (Merck)

0.1 M K₂HPO₄ (Merck)

1M NaOH (Merck)

Etil asetat (Merck)

n-hekzan (Merck)

Tampon (r-biopharm)

PBS-Tween Buffer (%0.05 tween 20 içeren 10 mM fosfat buffer, pH 7.4) (r-biopharm)

0 ppt (negatif kontrol), 25 ng/kg, 50 ng/kg, 100 ng/kg, 200 ng/kg, 400 ng/kg'lık kloramfenikol standart solüsyonlar (r-biopharm)

Substrat/kromojen (r-biopharm)

1 N H₂SO₄ (r-biopharm)

Stok solüsyonu (r-biopharm)

LC-MS/MS Analizi

Kloramfenikol

Kloramfenikol dış yükleme solüsyonu (Reidelde Haen)

Kloramfenikol-d5 deuterated kloramfenikol i (dahili) standart solüsyon (Cambridge Izotop Lab. (SCEC-001A))

Etil asetat (Merck)

Asetonitril (Merck)

n-hekzan (Merck)

Deiyonize su (Elga Purelab Prima)

Asetik asit (Merck)

Metanol (Merck)

Nitrofuran

Nitrofuran iç standart solüsyon (ZİVAK)

Nitrofuran dış yükleme solüsyon (ZİVAK)

Deiyonize su (Elga Purelab Prima)

Asetik asit (ZİVAK)

Metanol (ZİVAK)

Etil asetat (ZİVAK)

50 mM amonyum format (ZİVAK)

n-hekzan (ZİVAK)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (ZİVAK)

Alet/donati

ELISA Analizi

Ultra-turrax (Janke&Kunkel ıka-werk)

Spatül

10, 100 ve 1000 ml' lik balon joje

Hassas terazi (Mettler Toledo AB-204-S)

50 ml santrifüj tüpü
Manyetik karıştırıcı (Varimag electronicrührer poly 15)
Santrifüj (Sigma 3K15)
Cam tüp
Saat camı
Distile su cihazı (GFL 2108)
10 µl, 100 µl, 250 µl, 1000 µl mikropipet ve uçlar (Eppendorf)
Ben-mari (GFL 1002)
N₂ Tüpü
Filtre kağıdı
Etüv (Heraus Function Line)
Rotary evaporator (Heidolph Laborata 4001 + Nüve BD 402)
Vorteks (Nüve NM 110)
Pastör pipeti
Enro/sipro ELISA kiti (r-biopharm R3111 RIDASCREEN®)
Kloramfenikol ELISA kiti (r-biopharm R1505 RIDASCREEN®)
Nitrofuran AOZ ELISA kiti (r-biopharm R3701 RIDASCREEN®)
ELISA Mikro plate yıkayıcı (Rayto RT-2600C)
ELISA Mikro plate okuyucu (Rayto RT-2100C)
Okuma programı (r-biopharm RIDASCREEN ridawin 7.1 versiyonu)

LC-MS/MS Analizi

Soğutmalı santrifüj (Sigma 2-16K)
N₂ evaporatör-Numune yoğunlaştırıcı (Zymark Turbo Vap LV)
Çalkalamalı inkübatör (Edmund Bühler KS-15 Control)
Vortex mixer (Heidolph Multi Reax)
LC-MS/MS cihazı (Thermo Finigan TSQ LC-MS/MS)
LC-MS/MS cihazı (Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS/MS)
Xcalibur 1.3 TF1 - TSQ Quantum, Merlin Yazılım Programı-Kloramfenikol
Tandem Gold Workstation (Version 6.9.1) Programı-Nitrofuran
Kolon (Synergy MAX – RP 150 x 2.0 mm, 4µ)
Nitrofuran grubu HPLC kolonu 150x2.0 mm 4µ (ZİVAK)
100, 300, 1000 ve 5000 µl mikropipet ve uçlar (Eppendorf)

200, 1000, 5000 µl mikropipet ve uçlar (Medispec)
Hassas Terazî (Shimadzu, libror AEU-210)
pH metre (Mettler Toledo MP 220)
Ultrasonik banyo (Kudos SK 03GT)
10, 1000 ml balon joje
50 ml polipropilen tek kullanımlık santrifüj tüp
15 ml tek kullanımlık tüp
2 ml tek kullanımlık enjektör
0,45 µm membran filtre (RC)
1,8 ml HPLC flakonu
Mobil faz şişeleri
Spatül

Yöntem

ELISA ile Tavuk Etinde Enrofloksasin/Siprofloksasin Kalıntısı Tespiti

Örnek Hazırlama

100 gr tavuk eti ultra-turrax yardımı ile homojenize edildi. Homojenize edilmiş numunenin 1 gr'ı hassas terazide 50 ml'lik santrifüj tüpü içinde tartılarak, 4 ml % 70'lik metanol (% 70 metanol+% 30 distile su) ilave edildi. 10 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra, 20-25°C'de, 3000 g'de ve 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Takiben 3.25 ml'lik üst faz yıkama solusyonu olarak hazırladığımız PBS-tween buffer ile 1:2 (1+1) oranında cam tüpler içinde seyreltildi ve bunun 50 µl'si ELISA analizinde kullanıldı (108).

ELISA Analizi İçin Yıkama Çözeltilisinin Hazırlanması

PBS tween tamponu tuzu (% 0.05 tween 20 içeren 10 mM fosfat buffer, pH 7.4) 1 litre distile suda çözündürüldü. Hazırlanan bu tampon çözelti, mikro plate yıkama cihazına ait olan kaba aktarıldı.

ELISA Analizi

Kullanılan Enro/Cipro kitinin, enrofloksasin ve siprofloksasin hassasiyeti % 100, geri kazanım oranı % 90-110 ve kanatlı eti için tespit limiti (LOD) 10 µg/kg'dır (108).

Ekstraksiyon sonunda analiz için yeterli olacak sayıda kuyucuk Enro/sipro kitinin içinden alınarak, kuyucuk çerçevesine yerleştirdikten sonra, standart ve örnekleri koyacağımız kuyucuklar belirlendi ve işaretlendi. Kullandığımız tüm çözelti ve kimyasallar test başlangıcında, +4°C'den alınarak, 20-25°C'ye getirildi. Kuyucuklara, metanolik çözelti içinde 0 µg/kg (0 standart-negatif kontrol), 1 µg/kg, 3 µg/kg, 9 µg/kg, 27 µg/kg ve 81 µg/kg siprofloksasin olan 6 adet standart ve ekstraksiyonu tamamlanmış örneklerden 50 µl otomatik pipet yardımı ile aktarıldı. Her bir kuyucuğun dibine konjugat olarak siprofloksasin bağlı peroksidaz, daha sonra da kuyucuk içine 50 µl anti-siprofloksasin antikoru ilave edilerek, kuyucuklar hafifçe çalkalandı. 1 saat süreyle 20-25°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yaklaşık 250 µl yıkama tamponu ile 3 defa mikro plate yıkayıcı ile yıkandı. Kuyucuklara tetrametilbenzidin içeren 100 µl substrat/kromojen ilave edildikten sonra, 15 dakika oda sıcaklığında (20-25°C) ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu (1 N H₂SO₄) ilave edildi ve sonucu 30 dakika içerisinde 450 nm'de mikro plate okuyucusu ile okunup mevcut program ile değerlendirildi. Sonuçlar hesaplanırken, tavuk eti için dilüsyon faktörü 10 olarak alındı (108).

Her çalışma sonucunda standartlara ait kalibrasyon eğrisi oluşturulup, kite ait olan standart eğri ile karşılaştırıldı.

ELISA ile Tavuk Etinde Kloramfenikol Kalıntısı Tespiti

Örnek Hazırlama

100 gr olacak şekilde, tavuk eti ultra-turrax yardımı ile homojenize edildi. Kloramfenikol kalıntı tespiti enrofloksasin/siprofloksasin kalıntı tespiti için kullanılacak olan numuneler üzerinde gerçekleştirildi. Homojenize edilmiş numuneden 3 gr'ı 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak, 3 ml distile su ve 6 ml etil asetat ilave edildi. 10 dakika iyice karıştırıldıktan sonra (ters-düz ederek), 20-25°C'de 3000 g'de ve 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Yeni bir santrifüj tüpüne 4 ml etil asetat süpernatant (2 gr numuneye karşılık gelen)

alındı ve 60°C'lik benmari içinde N₂ tüplü sistem ile 5 psi basınç altında kurutuldu. Kuru kalıntı 1 ml n-hexan ile çözüldü ve 0.5 ml buffer ilave edilip yaklaşık 1 dakika süre ile iyice vortexlendi. Ayırma işlemi için 10 dakika, 3000 g'de, oda sıcaklığı 20-25°C olacak şekilde yeniden santrifüj edildi. Alttaki 50 µl'lik sıvı faz ELISA analizinde kullanıldı (177, 153).

ELISA Analizi İçin Yıkama Çözeltilisinin Hazırlanması

PBS tween tamponu tuzu (% 0.05 tween 20 içeren 10 mM fosfat buffer, pH 7.4) 1 litre distile suda çözüldürüldü. Hazırlanan bu tampon çözelti, mikro plate yıkama cihazına ait olan kaba aktarıldı.

ELISA Analizi İçin Enzim Konjugat Hazırlanması

Enzim konjugat, Tablo- 6'da belirtildiği gibi hazırlandı. Hazırlama sırasında kitle birlikte gelen konjugat ve buffer kullanıldı.

Tablo- 6: Enzim konjugatın hazırlanması

Numune Sayısı	Konjugat Miktarı	Buffer Miktarı
1-4	50 µl	500 µl
4-14	100 µl	1000 µl
15-24	150 µl	1500 µl
25-35	200 µl	2000 µl

ELISA Analizi

Kullanılan kloramfenikol kitinin spesifikliği kloramfenikol için % 100, geri kazanım oranı > % 80 ve LOD değeri 12.5 ng/kg olarak alındı (153).

Analiz için gerekli olacak sayıda kuyucuk alınarak, kuyucuk çerçevesine yerleştirildi. Standart ve örnekleri koyacağımız kuyucuklar belirlendi. Kuyucuklara 0-negatif kontrol, 25 ng/kg, 50 ng/kg, 100 ng/kg, 250 ng/kg ve 750 ng/kg standart ve örneklerden 50 µl otomatik pipet yardımı ile aktarıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl yukarıdaki tabloya göre

seyreltilmiş enzim konjugat ilave edilip, kuyucuklar hafifçe çalkalandı ve 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yaklaşık 250 µl yıkama tamponu ile 3 defa mikro plate yıkayıcı ile yıkandı. Kuyucuklara 100 µl substrat/kromojen ilave edilerek, 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Takiben kuyucuklara 100 µl stop solüsyon (1 N H₂SO₄) ilave edilerek sonuçlar 30 dakika içerisinde 450 nm’de mikro plate okuyucu ile okunup, mevcut program ile değerlendirildi. Sonuçlar hesaplanırken, tavuk eti için dilüsyon faktörü 0.25 olarak alındı (153, 177).

Çalışma içinde boş olarak çalışılan kuyucuğun etil asetatın kaynaklı olarak spektrofotometrede verdiği sayısal değer, tüm sonuçların verdiği değerden çıkarıldı ve LOD seviyesi 12.5 ng/kg olarak alındı, bunun üzerindeki sonuçlar pozitif olarak değerlendirildi.

Her çalışma sonucunda standartlara ait kalibrasyon eğrisi oluşturulup, kite ait olan standart eğri ile karşılaştırıldı.

ELISA ile Tavuk Karaciğerinde Nitrofuran, Furazolidon Metaboliti AOZ (3-amino-2-okzazolidinon) Kalıntısı Tespiti

Örnek Hazırlama

Yaklaşık 100 gr kadar karaciğer numunesi ultra-turrax yardımı ile homojenize edildi. Homojenizattan 1 gr’ı 50 ml’lik santrifüj tüpüne alınarak, üzerine 3.9 ml distile su, 0.5 ml 1 M HCl ve 100 µl dimetil sulfoksit’de çözüldürdüğümüz 10 mM 2-nitrobenzoik aldehit eklendi. 37°C’lik etüvde 1 gece (~16 saat) inkübe edilip, ertesi gün 5 ml 0.1 M K₂HPO₄, 0.4 ml 1 M NaOH ve 5 ml etil asetat ilave edildi. 1 dakika süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 10 dakika, 3000 g’de ve oda sıcaklığında santrifüj edilip, üstteki 2.5 ml’lik etil asetat fazı yeni bir santrifüj tüpüne alınarak rotary evaporatörde kurutuldu. Kalıntı 1 ml n-hekzanda çözdürülerek, 1 ml tampon eklendi. Aynı koşullarda tekrar santrifüj edilip, alt fazdaki 50 µl’lik sıvı kısım ELISA analizinde kullanıldı (144, 178).

ELISA Analizi İçin Yıkama Çözeltisinin Hazırlanması

PBS tween tamponu tuzu (% 0.05 tween 20 içeren 10 mM fosfat buffer, pH 7.4) 1 litre distile suda çözündürüldü. Hazırlanan bu tampon çözelti, mikro plate yıkama cihazına ait olan kaba aktarıldı.

ELISA Analizi

Kitin, geri kazanım oranı % 80-100, spesifikliğı AMOZ, AHD ve SEM için < % 0.01 ve LOD değeri 100 ng/kg'dır (144).

Analiz için gerekli olacak sayıda kuyucuk alınarak, kuyucuk çerçevesine yerleştirildi. Standard ve örnekleri koyacağımız kuyucuklar belirlendi. Kuyucuklara 0-negatif kontrol, 25 ng/kg, 50 ng/kg, 100 ng/kg, 200 ng/kg ve 400 ng/kg'lık standart ve ekstrakte edilmiş örneklerden 50 µl otomatik pipet ile aktarıldı. Her bir kuyucuğa 50 µl enzim konjugat, daha sonra 50 µl anti-AOZ antikorunu ilave edilerek kuyucuklar hafifçe çalkalandı ve 1 saat oda sıcaklığında (20-25°C) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yaklaşık 250 µl yıkama tamponu ile 3 defa mikro plate yıkayıcı ile yıkandı. Yıkamış kuyucuklara 100 µl substrat/kromojen enjekte edildikten sonra, 15 dakika oda sıcaklığında (20-25°C) ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 100 µl stop solüsyon (1 N H₂SO₄) ilave edilerek, sonuçlar 30 dakika içerisinde 450 nm'de mikro plate okuyucu ile okunup mevcut program ile değerlendirildi. Sonuçlar hesaplanırken, tavuk eti için dilüsyon faktörü 2 olarak alındı (144, 178).

Her çalışma sonucunda standartlara ait kalibrasyon eğrisi oluşturulup, kite ait olan standart eğri ile karşılaştırıldı.

ELISA Yükleme İçin Dış Standart Katılması

Enrofloksasin/siprofloksasin

Yükleme düzeyi 20 µg/kg'lık konsantrasyon elde edilmesi için 1 gr'lık homojenize et içine 1.6 µg/ml'lik stok standart solüsyondan 12.5 µl, 40 µg/kg'lık konsantrasyon düzeyi için

25 µl, 80 µg/kg'lık konsantrasyon düzeyi için 50 µl, 100 µg/kg için 75 µl eklendi ve örnek hazırlanması aşamasına geçilmeden önce yaklaşık 30 dakika bekletildi.

Kloramfenikol

50 µg/kg'lık stok solüsyondan 1 birim, buffer'dan ise 9 birim alınarak 5 ng/ml (ppb)'lik 2. çalışma solüsyonu hazırlandı. Sonrasında 3 gr ete 50 µg/kg (0,05 ppb) için 30 µl, 100 µg/kg için 60 µl, 200 µg/kg için 120 µl eklendi ve örnek hazırlanması aşamasına geçilmeden önce yaklaşık 30 dakika bekletildi.

Nitrofuran AOZ

20 ng/ml'lik stok solüsyonundan 2 ng/ml'lik 2. çalışma solüsyonu elde edilmesi için stok solüsyonu 1/9 oranında metanol ile dilue edildi (0,5 ml spike solüsyon 1+4,5 ml metanol).

Hazırlanan yükleme solüsyonları -20°C'de saklandı ve yüklemeler yapılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Yükleme seviyesi 100 ppt için 1 gr homojenize örneğe, hazırlanan 2. çalışma solüsyonundan 50 µl, 150 ng/kg'lık seviye için 75 µl, 200 ng/kg'lık seviye için 100 µl, 400 ng/kg'lık seviye için 200 µl, 500 ng/kg'lık seviye için 250 µl eklendi ve 30 dakika çözücünün uçması için bekletilerek daha önce belirtildiği gibi örnek hazırlamaya devam edildi.

LC-MS/MS ile Tavuk Etinde Kloramfenikol Kalıntısı Tespiti

Sistemin prensibi; etil asetat ile kloramfenikolün ekstraksiyonu, ekstraktın temizlenip saflaştırılması ve LC-MS/MS sistemi ile belirlenip sayılması esasına dayanmaktadır.

Çalışılan bu metod E.U. Commission Decision 2002/657 (150)'ye göre valide edilmiş olup validasyon sonuçları Ekler kısmında verilmiştir.

Standart Solüsyonların (dış yükleme ve iç) Hazırlanması

S₀ stok çözelti hazırlanması (1 mg/ml): Hassas terazide bir kısım standart tartıldı. Üzerine konması gereken metanol kütlesi hesaplandı. Terazî sıfırlanarak, darası alınarak ölçüde metanol konuldu. 15 sn ultrasonik banyoda bekletilip, vorteks ile homojen hale getirildi.

S₁ stok çözelti hazırlanması (10 µg/ml): S₀'dan 100 µl alınarak, metanol ile 10 ml hacime tamamlanır.

S₂ stok çözelti hazırlanması (10 ng/ml): S₁ 'den 50 µl alınarak, su içinde 50 ml hacime tamamlanır.

Cap-d5 (İS) 20 ng/ml : (10 µg/ml) olarak hazırlanan çözeltilerden 80 µl alınarak, 40 ml'ye tamamlanır.

Hazırlanan standart çözeltiler ve konsantrasyonları Tablo- 7'de gösterilmektedir.

Tablo- 7: Hazırlığı yapılan standart çözeltiler

Standart Çözeltiler	Konsantrasyon	Toplam Hacim
Stok Çözelti S ₀	1 mg / ml	X ..(metanolde)
Çalışma Çözeltisi S ₁	10 µg / ml	S ₀ 100 µl / 10 ml (metanol)
Çalışma Çözeltisi S ₂	10 ng / ml	S ₁ 50 µl / 50 ml (su)
Çalışma Çözeltisi (İS)	20 ng / ml	S ₁ 80 µl / 40 ml (su)

Çalışma için, 50 ng/ml'lik olarak hazırlanan stok solüsyondan 80 µl alınarak üzerine 920 µl metanol ilave edildi. Böylece 4 ng/ml'lik çalışma solüsyonu elde edildi. $(50 \cdot b) / 1$ ml:4 olarak formüle ediyoruz.

Örnek Ekstraksiyonu

Doğrulama için getirilen homojenize tavuk eti örnekleri, 50 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine 2 gr tartıldı. 20 ng/ml (ppb) CAP-d5 kloramfenikol iç standarttan 50 µl (0.5 ppb) ilave edildi. 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, 6 ml etil asetat eklenerek, 200 rpm' de 15 dakika çalkalayıcı inkübatörde karıştırıldı. Takiben 4000 g' de ve +4°C' de 15 dakika santrifüj edildi. 5 ml supernatant, 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve N₂ evaporatörde, 40°C' de 5 psi basınçla 1 saat kurutuldu. 500 µl'lik % 85 deiyonize su ve % 15 metanol karışımı kurutulmuş tüplere eklendi. 2000 rpm' de 5 dakika vortexlenerek çözdürüldü. 0.45 µm'lik filtrelerden geçirilerek HPLC flakonlarına aktarıldı. 50 µl'si LC-MS/MS cihazına enjeksiyon yapılarak analize alındı.

Matriks Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

1.tüp: 2 gr numune + 50 µl CAP-d5 (kör)

2.tüp: 2 gr numune + 50 µl CAP-d5 + 50 µl 4 ng/ml'lik dış yükleme solüsyonu: 0.1 ng/ml

3.tüp: 2 gr numune + 50 µl CAP-d5 + 100 µl 4 ng/ml'lik dış yükleme solüsyonu: 0.2 ng/ml

4.tüp: 2 gr numune + 50 µl CAP-d5 + 150 µl 4 ng/ml'lik dış yükleme solüsyonu: 0.3 ng/ml

5.tüp: 2 gr numune + 50 µl CAP-d5 + 200 µl 4 ng/ml'lik dış yükleme solüsyonu: 0.4 ng/ml eklendikten sonra 10 dakika bekletildi (179).

Mobil Faz Hazırlanması

998 ml deiyonize su, 2 ml asetik asit ile karıştırıldı ve ultrasonik banyoya bırakıldı. 2/1000'lik asetik asit elde edildi.

Mobil Faz A: % 0.2 deiyonize su içinde asetik asit

Mobil Faz B: Metanol

LC-MS/MS Analizi

Mobil faz hazırlanarak, cihaz 0.20 ml/dak akış hızına geçirildi. Analiz “triple-quadrapole tandem mass spectrometer” (Resim- 1) ile, negatif iyonize modda (Resim- 2) gerçekleştirildi.



Resim- 1: TSQ Tandem Gold Triple-Quadrapole kütle spektrometre

MS/MS Şartları

Cihaz	: TSQ Termofinigan
İyon Kaynağı	: ESI 5000 V
Kaynak Sıcaklığı	: 350°C
Tarama türü	: SRM (Selected reaction monitoring)
Aux gazı	: 10
Sprey gazı	: 60
Argon gazı	: 1
Tüp denkleştirme	: 81
Q1 piki genişlik m/z	: 0.7 FWHM
Q3 piki genişlik m/z	: 0.7 FWHM

Otomatik Örnekleyici Parametreleri

Enjeksiyon iğnesinin tabandan yüksekliği	: 2.0 mm
Enjeksiyon miktarı	: 50 µl
Enjeksiyon sonrası valf değişim zamanı	: 0.0 dak
Döngü yükleme zamanı	: 5 µl/s
Enjeksiyon hızı	: 8 µl/s
Sifon/yıkama kaynağı (yıkama şişesinde)	: 20/80 (v/v) metanol/su.
Sifon/yıkama hacmi	: 1000 µl
Sifon hızı	: 250 µl/s
Tabla sıcaklık kontrol	: 10°C
Kolon sıcaklığı	: 40°C

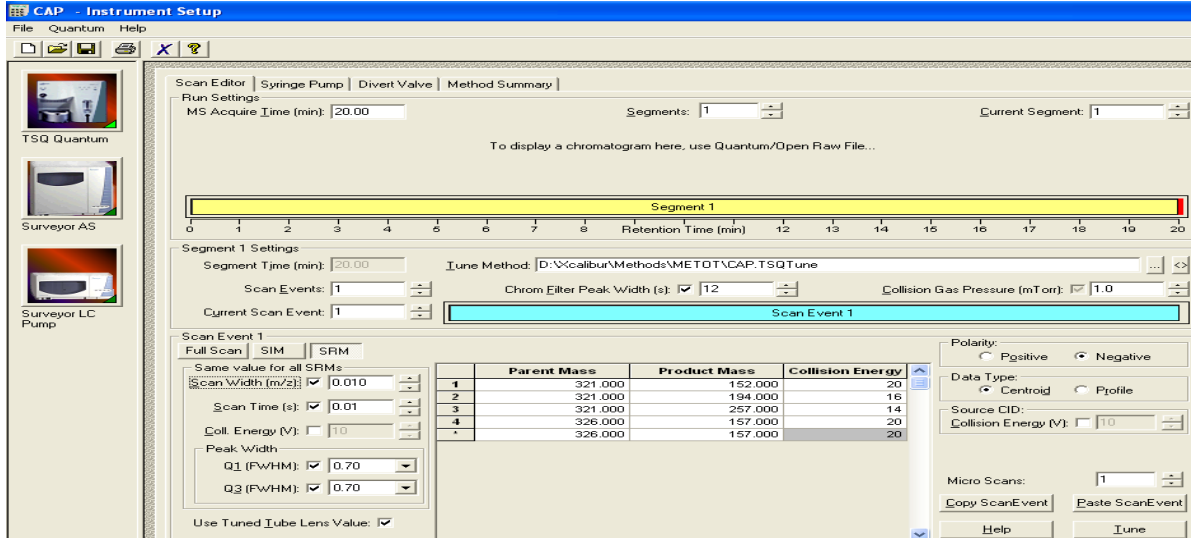
Negatif iyonizasyon: 321=152

321=194

326=157 iyonuna parçalandı (Resim- 2, Tablo- 8)

Tablo- 8: Taranacak iyonlar

Bileşik	MW	RT	Parçalanma Ürünleri	Parçalanma Enerjisi	Polarizasyon
Cap (dış standart)	321	7.95±0,2	152/194/257	20/16/14	Neg(-)
Cap-d5 (iç standart)	326	7.95±0,2	157	20	Neg(-)



Resim- 2: Negatif iyonizasyon ayarları

LC Pompa Parametreleri

Sabit Faz : Synergy 4 μ , MAX-RP 80 A, 150 x 2.00 mm, 4 micron (Resim- 3)

Mobil faz A : % 0.2 asetik asit

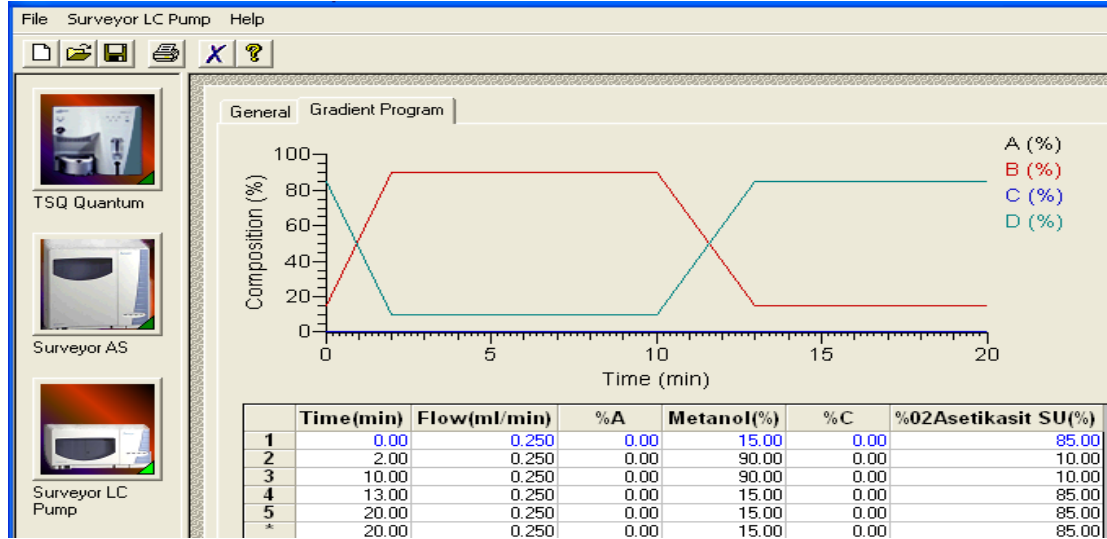
Mobil faz B : Metanol

Analiz süresi : 20 dakika

Akış Hızı : 0.25 ml/dak (Resim- 4 ve Tablo- 9)



Resim- 3: Kolon; synergy 4 μ , MAX-RP 80 A, 150 x 2.00 mm, 4 micron



Resim- 4: Mobil faz akış diyagramı

Tablo- 9: Süreye göre mobil faz değişimi

Sıra No	Dakika	Akış hızı	Mobil faz A	Mobil faz B
1	0	0.25	85	15
2	2	0.25	90	10
3	10	0.25	90	10
4	13	0.25	85	15
5	20	0.25	85	15

Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplama

Elde edilen pik alanları ve iç standart alanı miktarları, X Calibur Finnigan-Merlin programına kayıt edilerek sonuçlar alındı.

Programda, sonuçlar aşağıdaki şekilde elde edildi:

İlk olarak elde edilen pikler doğrulama kriterleri yönünden incelendi. Bu kriterler;

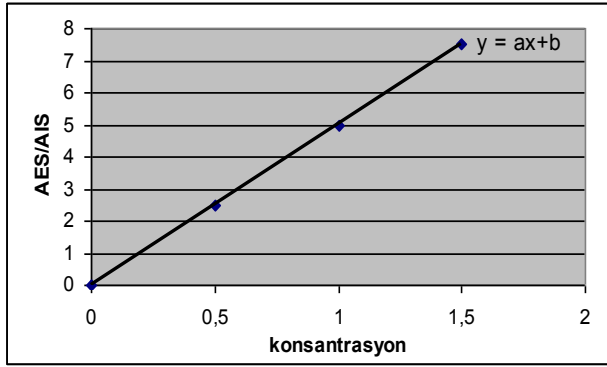
- 1- Retensiyon zamanı'nın standarttan % 5 farkı.

2- İki iyonun oranının standarttaki orandan % 10 farkı.

Pozitif numunelerin hesapları yapılırken; alan/(dahili) iç standart oranı “y” olarak alındı (y = analiz sonunda elde edilen alan, x = bulunacak miktar). Regresyon analizi (değişkenler arası ilişki) grafiği bu şekilde çıkartılarak hesaplama yapıldı (180).

Sonuçlar, cihaz programından ya da belli oranlardaki standartlar eklenerek elde edilen matrikslerin (matriks standart numunesi) analizi sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplandı.

Matriks standart numunesinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan, ilgili piklerin alanları tayin edildi. Her pik alanının, iç standart pik alanına oranları hesaplandı.



AES: Matriks standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili kloramfenikol pikinin alanı

AIS: Matriks standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı

Hesaplanan bu değer, konsantrasyona karşılık grafiğe geçirildi.

Analiz sonucunda numunede tespit edilen kloramfenikol pikinin alanı, ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konuldu ve sonuç hesaplandı. Analiz sonucu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : $x=(y-b)/a$

LC-MS/MS ile Tavuk Karaciğerinde Nitrofuran Kalıntısı Tespiti

Bu metot 4 aşamada gerçekleştirildi;

1- Asit ortamda serbest ve dokuya bağlı nitrofuran kalıntılarının 2-nitrobenzaldehit ile türevlendirilmesi

Furazolidon metaboliti : (AOZ) 3-amino-2-okzazolidinon,
Furaltadon metaboliti : (AMOZ) 5-metil-morfolino-3-amino-2-okzazolidinon,
Nitrofurazon metaboliti : (SEM) semikarbazid,

Nitrofurantion metaboliti : (AHD) 1-aminohidantoin.

- 2- Baz ilavesi ile türevlendirme reaksiyonunun durdurulması
- 3- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması
- 4- LC-MS/MS tekniği ile analizin yapılması.

Çalışılan bu metod E.U. Commission Decision 2002/657 (150)'ye göre valide edilmiş olup validasyon sonuçları Ekler kısmında verilmiştir.

Standart Solüsyonların (dış yükleme ve iç) Hazırlanması

Tablo- 10: Nitrofuran dış standart karışımı içeriği ve konsantrasyonları

Analit	MW	Konsantrasyon µg/l (ppb)
AMÖZ	201.2	20
AOZ	102.1	20
AHD	151.5	20
SEM	111.5	20

Tablo- 11: Nitrofuran iç standart ve konsantrasyonu

Analit	MW	Konsantrasyon µg/l (ppb)
AMÖZ-D5	206.2	40
AOZ-D5	106.1	40
SEM-13C ₁₅ N ₂	114.5	100

Örnek Ekstraksiyonu

Doğrulamaya alınan homojenize tavuk eti örnekleri, 50 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine 2 gr tartıldı. 100 µl iç standart ve 5 ml % 1'lik asetik asit ilave edilerek, çalkalamalı etüvde 300 rpm'de, oda sıcaklığında 1 dakika karıştırıldı. 300 µl dimetil sülfoksit ilave edilerek, multireaks vorteksin son hızında 1 dakika süreyle vortekslendi. Türevlendirme için, 50 rpm hızda ve 37°C'ye ayarlı çalkalamalı etüvde 16 saat bekletildi. Türevlendirmeden sonra, örnekler etüvden alınarak oda sıcaklığına gelmesi için bekletildi. 700 µl 50 mM amonyum format ilave edildikten sonra, çalkalamalı etüvde 300 rpm'de ve oda sıcaklığında 1 dakika karıştırıldı. Üzerine 5 ml etil asetat ilave edilerek, çalkalamalı etüvde 300 rpm'de oda sıcaklığında 2 dakika daha karıştırıldı. 3 ml hekzan ilave edilip, multireaks vorteksin son hızında 2 dakika vortekslendi. 4000 g'de 15°C'ye ayarlı santrifüjde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, üstteki çözeltiden pipet ile 6 ml (2x3 ml) alınıp 15 ml'lik cam tüpe aktarıldı ve azot akımı altında 42°C sıcaklıkta ve 5.0 psi basınçta kurutuldu. Kurutma işleminden sonra tüpe 1 ml daha hekzan ilave edildi. Multireaks vorteksin 7. hızında, 1 dakika karıştırma işlemine maruz bırakıldı. 750 µl metanol ilave edildi ve multireaks vorteksin 7. hızında 1 dakika yeniden karıştırıldı. 2500 g'de, 15°C'ye ayarlı santrifüjde 10 dak santrifüj edilip, 5 dakika ortam sıcaklığında bekletildi. Enjektör yardımıyla alt fazdan numune alınıp, enjektöre takılan 0.45 µm filtreden geçirilerek polipropilen HPLC flakonuna alındı. LC-MS/MS sistemine, 75 µl enjeksiyon yapıldı (181).

Matriks Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

3 adet 2 gr blank (kör) doku numunesi, 50 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve üzerine aşağıdaki tabloya uygun iç standart ilave edildi.

Tablo- 12: 2 gr numune için yükleme miktarları

Dokudaki Konsantrasyon	0.5 µg/kg (0,5MRPL)	1 µg/kg (1MRPL)	1.5 µg/kg (1,5MRPL)
Eklenecek Standart Hacmi	50 µl	100 µl	150 µl

Mobil Faz Hazırlanması

Mobil Faz A: % 0.2 asetik asit

Mobil Faz B: Metanol

LC-MS/MS Analizi

Mobil faz hazırlanarak, cihaz 0.20 ml/dak akış hızına geçirildi. Analiz “ Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS/MS” (Resim- 5) ile negatif iyonize modda gerçekleştirildi.



Resim- 5: Zivak Tandem Gold Triple Quadrapole LC-MS/MS

MS/MS Şartları

İyonizasyon modu	:	ESI +
API sisleme gaz basıncı	:	55 psi
Gaz sıcaklığı	:	400°C
Gaz basıncı	:	40 psi
Tarama zamanı	:	0.725 saniye
SIM genişliği	:	1.0 amu
İğne	:	+ 5000 V
Kalkan	:	+ 500 V
Kapiller	:	30 V

Dedektör : + 1700 V
CID gazı basıncı : 2.00 m Torr
Sprey bölümü sıcaklığı : 65°C
Kütle alan genişliği (amu) : Q1=1.0 Q3=1.0

Otomatik Örnekleyici Parametreleri

Tablo- 13: Otomatik örnekleyici parametreleri

Analit	MS MH+ (m/z)	MS-MS (m/z)	Kapillar	Parçalama Enerjisi	Dwell Zamanı
2-NP-SEM	209.00	166.00	30	7	0.200
2-NP-SEM-13C ₁₅ N ₂	212.00	168.00	30	7	0.075
2-NP-AHD	249.00	134.00	40	9	0.200
2-NP-AOZ	236.00	134.00	30	9	0.075
2-NP-AOZ-D4	240.00	134.00	30	9	0.050
2-NP-AMAZ	335.00	291.00	30	9	0.075
2-NP-AMAZ-D5	340.00	296.00	30	9	0.050

LC Pompa Parametreleri

Tablo- 14: LC pompa parametreleri

Zaman	% A	% B	Akış Hızı (ml/dak)
00:00	85	15	0.20
03:00	50	50	0.20
07:00	30	70	0.20
09:30	25	75	0.20
09:31	0	100	0.20
12:00	0	100	0.20
12:06	85	15	0.25
17:00	85	15	0.25
17:06	85	15	0.20
20:00	85	15	0.20

Kolon-Duran Faz: Nitrofuran grubu HPLC kolonu 150 x 2.0 mm 4 μ

Akış hızı: 0.20 ml/dak

Enjeksiyon hacmi: 75 μ L

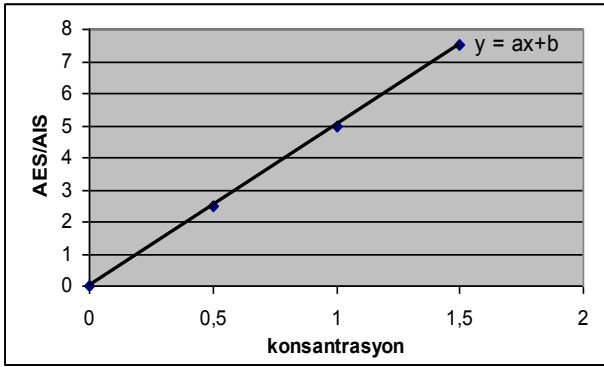
Otomatik örnekleyici yıkama solventi: 15/85 MeOH: su karışımı (h/h)

Analiz süresi: 20 dakika

Sonuçların Değerlendirilmesi ve Hesaplama

Sonuçlar cihaz programından ya da belli oranlardaki standartlar eklenerek elde edilen matrikslerin (matriks standart numuneleri) analizi sonucu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

Matriks standart numunelerinin enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlardan ilgili piklerin alanları tayin edildi. Her pik alanının, iç standart pik alanına oranları hesaplandı.



AES: Matriks standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili nitrofuran pikinin alanı

AIS: Matriks standart numunesinin analizinden elde edilen ilgili iç standart pikinin alanı

Hesaplanan bu değer, konsantrasyona karşılık grafiğe geçirildi.

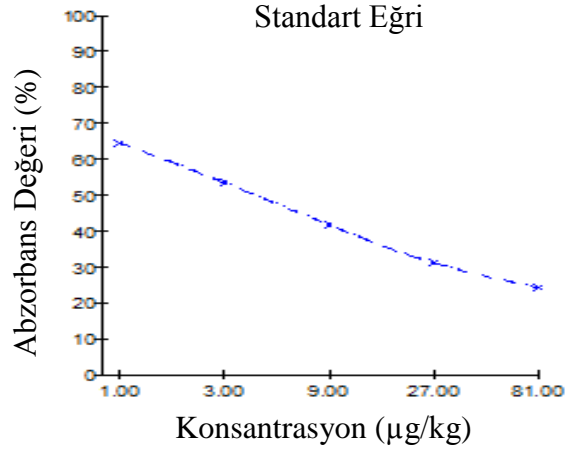
Analiz sonucunda numunede tespit edilen nitrofuran pikinin alanı, ilgili iç standardın alanına oranlanarak (y değeri) doğru denkleminde ($y=ax+b$) yerine konuldu ve sonuç hesaplandı. Analiz sonucu (μ g/kg) : $x=(y-b)/a$

BULGULAR

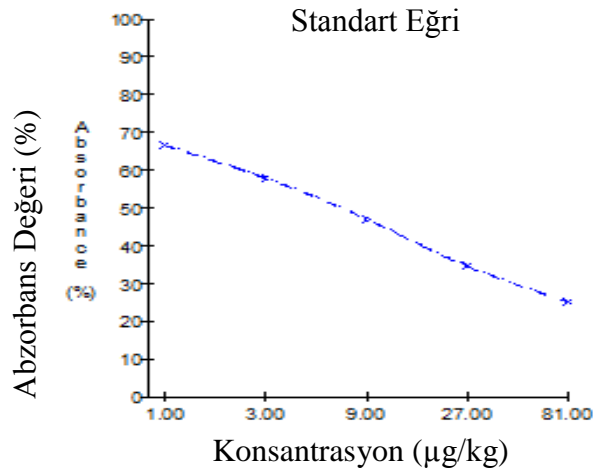
ELISA Analizi

Enrofloksasin/siprofloksasin için yapılan analizler sonucunda, kit içersinde verilen standart kalibrasyon eğrileri ile, çalışmamızın doğruluğunu kıyaslamamıza yarayan 0 µg/kg, 1 µg/kg, 3 µg/kg, 9 µg/kg, 27 µg/kg ve 81 µg/kg'lık standartlar kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil- 8'de sunulmaktadır.

(A) **Kit değeri (% B/B0)** 3.9 **Toplam çalışma sayısı (n)** 6



(B) **Kit değeri (% B/B0)** 6.6 **Toplam çalışma sayısı (n)** 14



Şekil- 8 (A, B): İki farklı kit için 0 µg/kg, 1 µg/kg, 3 µg/kg, 9 µg/kg, 27 µg/kg ve 81 µg/kg seviyelerinde elde edilen kalibrasyon eğrileri (% B/B0-IC 50) ve toplam çalışma sayısı

Kitlerin içinden Şekil- 8’de görüldüğü üzere iki farklı özellik ve değerde standart eğri çıkmıştır. İlk standart eğri (A) (% B/B0) değeri 3.9 µg/kg, ikinci standart eğri (B) (% B/B0) değeri ise 6.6 µg/kg’dır. İlk standart eğri ile 6 çalışma yapılarak ortalamada 4.08 µg/kg, ikinci standart eğri ile 14 çalışma yapılarak ortalamada 6.85 µg/kg’lık değer elde edildi. Elde edilen standart eğrilerin ortalama değerleri ± % 10’luk hata sınırı içindedir.

ELISA analizinde çalışmadaki geri kazanım ve doğruluğu hesaplamak için, enrofloksasin/siprofloksasin için 20 adet blank (kör) numuneye yapılan 20 µg/kg, 40 µg/kg, 60 µg/kg, 80 µg/kg ve 100 µg/kg’lik yüklemeler sonucunda elde edilen miktar % 101.34 (91.19-126.55) olarak belirlendi.

Tablo- 15’de ELISA ile analiz edilen tavuk etlerinde enrofloksasin/siprofloksasin kalıntılarının ortalama, minimum ve maksimum seviyeleri (µg/kg) verilmektedir.

Çalışmada kullanılan 90 adet but örneğinin 4 (% 4.4)’ünde ortalama 12.83 µg/kg’lık seviyede, 90 adet göğüs örneğinin ise 8 (% 8.9)’inde ortalama 20.2 µg/kg seviyesinde kalıntı tespit edildi. Enrofloksasin/siprofloksasin kalıntı seviyeleri but etlerinde 10.59-14.2 µg/kg, göğüs etlerinde ise 11.14- 49.18 µg/kg değerleri arasında değişti.

Tablo- 15: ELISA analizinde tespit edilen enrofloksasin/siprofloksasin kalıntıları değerleri

Örnek Türü	Pozitif örneklerin sayısı (%)	Ortalama kalıntı seviyesi (µg/kg)	SD (µg/kg)	Minimum (µg/kg)	Maksimum (µg/kg)
But	4 (4.4)	12.83	1.558	10.59	14.2
Göğüs	8 (8.9)	20.2	13.19	11.14	49.18
Toplam	12 (6.7)	17.74	11.161	10.59	49.18

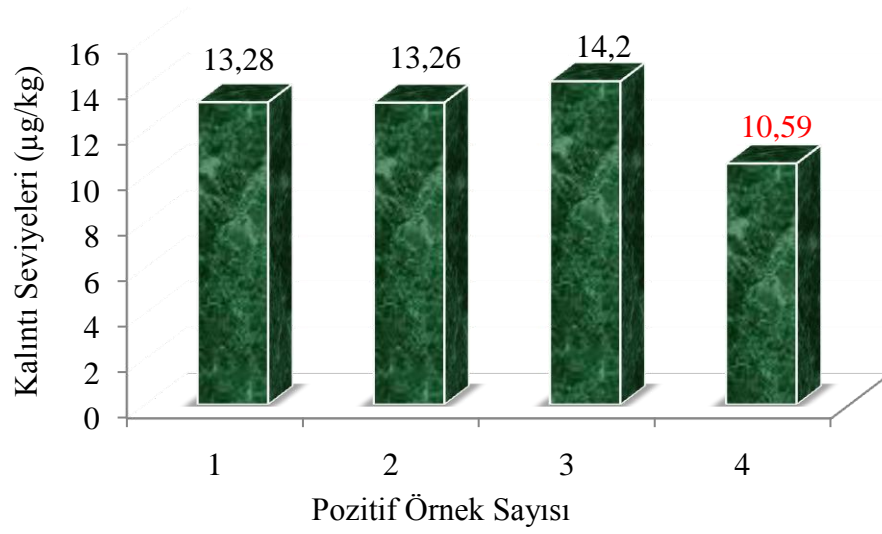
Çalışma sonucunda analize alınan toplam 180 adet örneğin 168 (% 93.3)’inde tespit limitinin altında (LOD, 10 µg/kg), kalan 12 adet (% 6.7) örnekte ise >LOD seviyelerinde kalıntıya rastlandı. Enrofloksasin/siprofloksasin kalıntı seviyelerine ilişkin frekans dağılımı Tablo- 16’da, but (A) ve göğüs (B) etlerinde belirlenen kalıntı konsantrasyonları ise Şekil- 9’da sunulmaktadır.

Tablo- 16: Tavuk eti örneklerinde enrofloksasin/siprofloksasin kalıntı düzeylerinin dağılımı

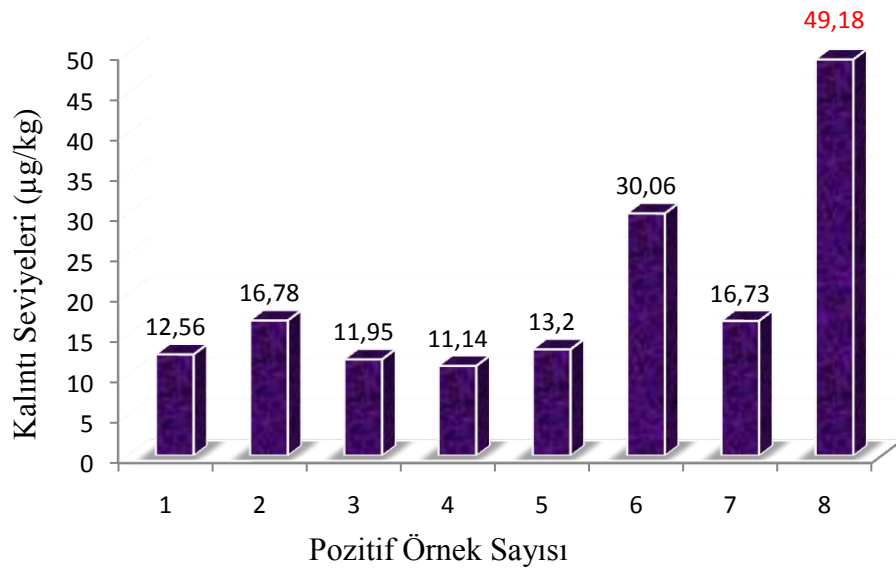
Enrofloksasin/Siprofloksasin Seviyeleri ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Örneklerin Sayısı	Sıklığı (%)
<LOD ^a	168	93.3
10-25	10	5.5
25-40	1	0.5
>40	1	0.5

^aTespit limiti: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

(A)



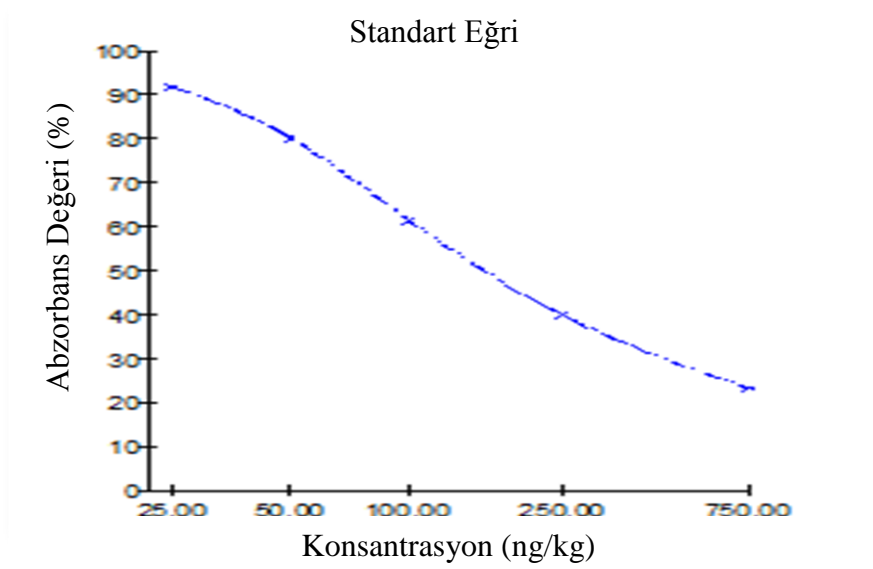
(B)



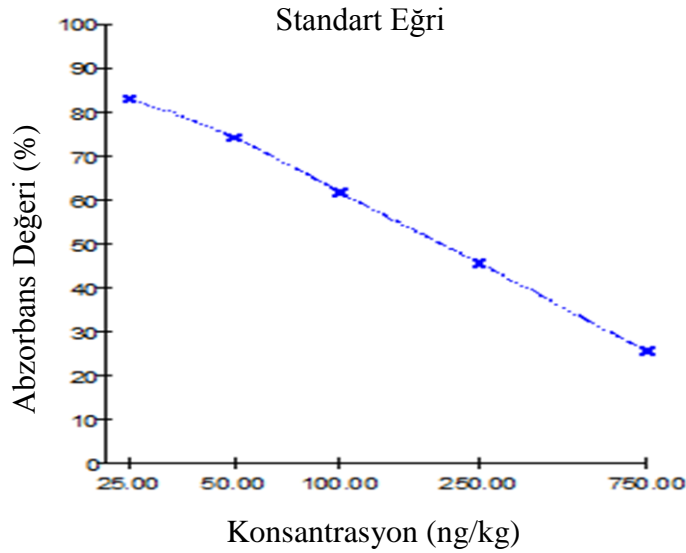
Şekil- 9: ELISA ile analiz edilen tavuk but (A) ve göğüs (B) etlerinde enrofloksasin/siprofloksasin pozitif örneklerin sayısı ve kalıntı düzeyleri

Kloramfenikol için yapılan analizler sonucunda, kit içerisinde verilen standart kalibrasyon eğrileri ile, çalışmamızın doğruluğunu kıyaslamamıza yarayan 0 ng/kg, 25 ng/kg, 50 ng/kg, 100 ng/kg, 250 ng/kg ve 750 ng/kg'lık standartlar kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil- 10'da sunulmaktadır.

	Kit değeri (% B/B0)	Toplam çalışma sayısı (n)
(A)	<u>148.3</u>	<u>17</u>



(B)	<u>193.8</u>	<u>3</u>
-----	--------------	----------



Şekil- 10 (A, B): İki farklı kit için 0 ng/kg, 25 ng/kg, 50 ng/kg, 100 ng/kg, 250 ng/kg ve 750 ng/kg seviyelerinde elde edilen kalibrasyon eğrileri (% B/B0-IC 50) ve toplam çalışma sayısı

Kitlerin içinden Şekil- 10'da görüldüğü üzere iki farklı özellik ve değerde standart eğri çıkmıştır. İlk standart eğri (A) (% B/B0) değeri 148.3 ng/kg, ikinci standart eğri (B) (% B/B0) değeri ise 193.8 ng/kg'dır. İlk standart eğri ile 17 çalışma yapılarak ortalamada 156.51 ng/kg, ikinci standart eğri ile 3 çalışma yapılarak ortalamada 190.03 ng/kg'lık değer elde edildi. Elde edilen standart eğrilerin ortalama değerleri \pm % 10'luk hata sınırı içindedir.

ELISA analizinde çalışmadaki geri kazanımı ve doğruluğu hesaplamak için, kloramfenikol için 20 adet blank (kör) numuneye yapılan 50 ng/kg, 75 ng/kg, 100 ng/kg, 150 ng/kg ve 200 ng/kg'lık yüklemeler sonucunda elde edilen miktar % 89.30 (72.4-100.72) olarak belirlendi.

Tablo- 17'de ELISA ile analiz edilen tavuk etlerinde kloramfenikol kalıntılarının ortalama, minimum ve maksimum seviyeleri (ng/kg) verilmektedir.

Çalışmada kullanılan 90 adet but örneğinin 10 (% 11.1)'unda ortalama 31.32 ng/kg'lık seviyede, 90 adet göğüs örneğinin ise 5 (% 5.5)'inde ortalama 73.34 ng/kg seviyesinde kalıntı tespit edildi. Kloramfenikol kalıntı seviyeleri but etlerinde 12.64-56.45 ng/kg, göğüs etlerinde ise 13.32- 226.22 ng/kg değerleri arasında değişti.

Tablo- 17: ELISA analizinde tespit edilen kloramfenikol kalıntıları değerleri

Örnek Türü	Pozitif örneklerin sayısı (%)	Ortalama kalıntı seviyesi (ng/kg)	SD (ng/kg)	Minimum (ng/kg)	Maksimum (ng/kg)
But	10 (11.1)	31.32	15.23	12.64	56.45
Göğüs	5 (5.5)	73.34	88.60	13.32	226.22
Toplam	15 (8.4)	45.32	53.03	12.64	226.22

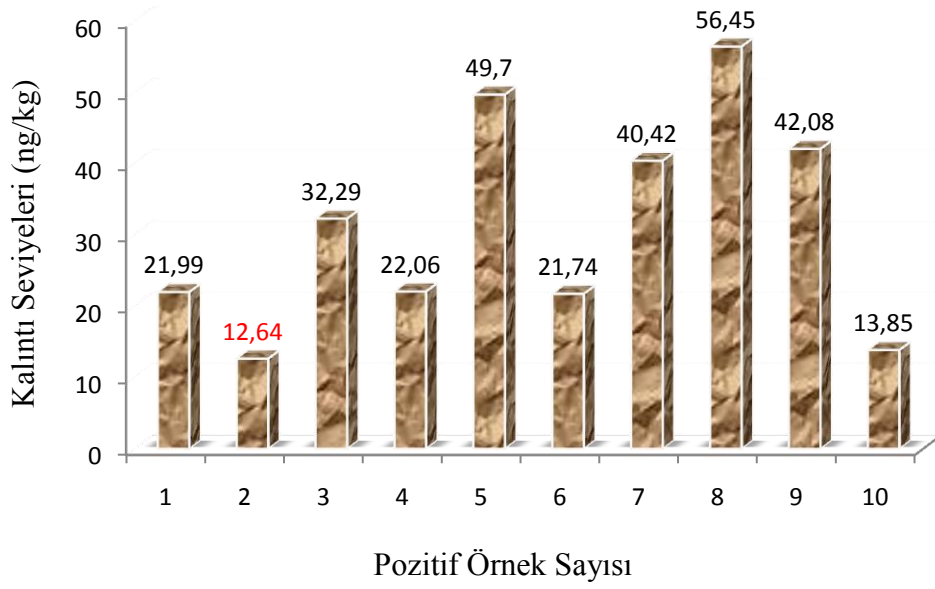
Çalışma sonucunda analize alınan toplam 180 adet örneğin 165 (% 91.6)'inde tespit limitinin altında (LOD, 12.5 ng/kg), kalan 15 adet (% 8.4) örnekte ise >LOD seviyelerinde kalıntıya rastlandı. Kloramfenikol kalıntı seviyelerine ilişkin frekans dağılımı Tablo- 18'de, but (A) ve göğüs (B) etlerinde belirlenen kalıntı konsantrasyonları ise Şekil- 11'de sunulmaktadır.

Tablo- 18: Tavuk eti örneklerinde kloramfenikol kalıntı düzeylerinin dağılımı

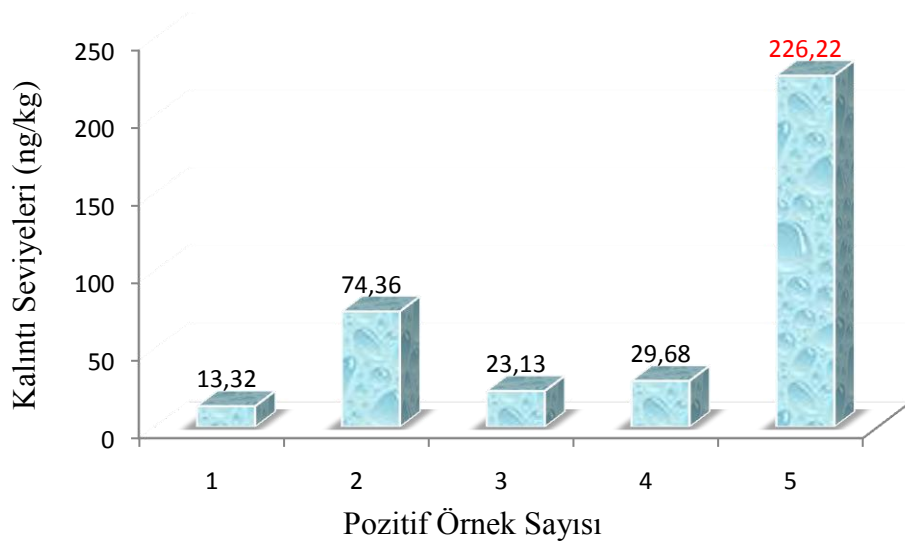
Kloramfenikol Seviyeleri (ng/kg)	Örneklerin Sayısı	Sıklığı (%)
<LOD ^a	165	91.6
12.5-37.5	9	5
37.5-62.5	4	2.2
62.5-87.5	1	0.5
>87.5	1	0.5

^aTespit Limiti: 12.5 ng/kg

(A)



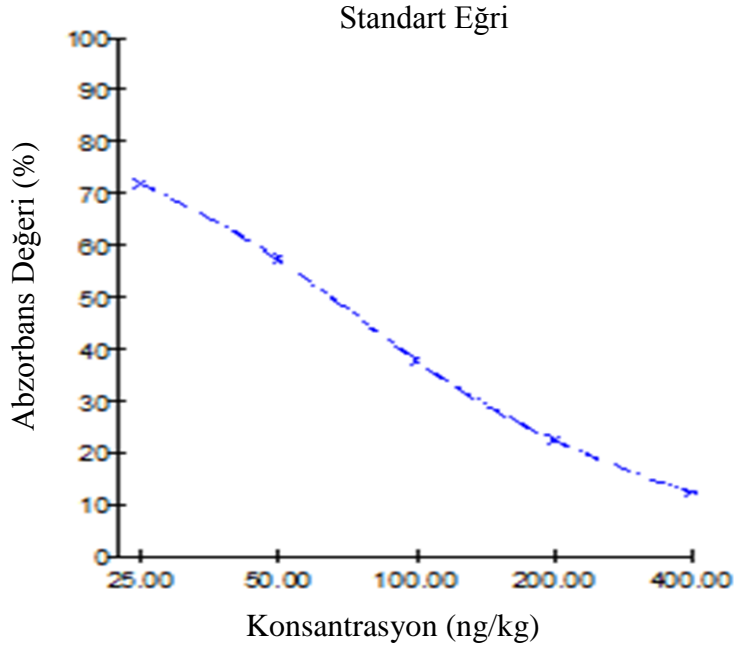
(B)



Şekil- 11: ELISA ile analiz edilen tavuk but (A) ve göğüs (B) etlerinde kloramfenikol pozitif örneklerin sayısı ve kalıntı düzeyleri

Nitrofuran AOZ için yapılan analizler sonucunda, kit içersinde verilen standart kalibrasyon eğrileri ile çalışmamızın doğruluğunu kıyaslamamıza yarayan 0 ng/kg, 25 ng/kg, 50 ng/kg, 100 ng/kg, 200 ng/kg ve 400 ng/kg'lik standartlar kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil- 12'de sunulmaktadır.

Kit değeri (% B/B0)	Toplam çalışma sayısı (n)
63.4	10



Şekil- 12: Tek kit için 0 ng/kg, 25 ng/kg, 50 ng/kg, 100 ng/kg, 200 ng/kg ve 400 ng/kg seviyelerinde elde edilen kalibrasyon eğrileri (% B/B0-IC 50) ve toplam çalışma sayısı

Çalışmada Şekil- 12'de görüldüğü üzere tek değerde standart eğri kullanılmıştır. Standart eğri (% B/B0) değeri 63.4 ng/kg'dır. Bu standart eğri ile 10 çalışma yapılarak ortalamada 66.56 ng/kg'lık değer elde edildi. Elde edilen standart eğrilerin ortalama değerleri \pm % 10'luk hata sınırı içindedir.

ELISA analizinde, çalışmadaki geri kazanımı ve doğruluğu hesaplamak için, nitrofuran AOZ için 10 adet blank (kör) numuneye yapılan 150 ng/kg, 200 ng/kg, 400 ng/kg ve 500 ng/kg'lık yüklemeler sonucunda elde edilen miktar % 94.76 (81.94-104.57) olarak belirlendi.

Tablo- 19’da ELISA ile analiz edilen tavuk etlerinde nitrofuran AOZ kalıntılarının ortalama, minimum ve maksimum seviyeleri (ng/kg) verilmektedir.

Çalışmada kullanılan 90 adet karaciğer örneğinin 11 (% 12.2)’inde ortalama 212.24 ng/kg seviyesinde kalıntı tespit edildi. Nitrofuran AOZ kalıntı seviyeleri karaciğerde 103.79-1027.83 ng/kg değerleri arasında değişti.

Tablo- 19: ELISA analizinde tespit edilen nitrofuran AOZ kalıntıları değerleri

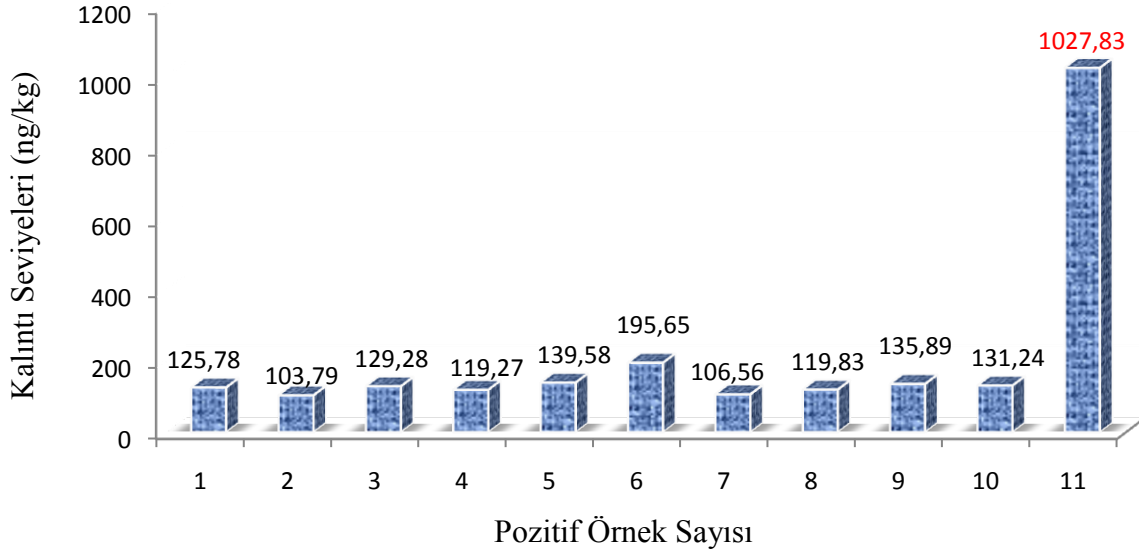
Örnek Türü	Pozitif örneklerin sayısı (%)	Ortalama kalıntı seviyesi (ng/kg)	SD (ng/kg)	Minimum (ng/kg)	Maksimum (ng/kg)
Karaciğer	11 (12.2)	212.24	271.5	103.79	1027.83

Çalışma sonucunda analize alınan toplam 90 adet örneğin 79 (% 87.8)’unda tespit limitinin altında (LOD, 100 ng/kg), kalan 11 adet (% 12.2) örnekte ise >LOD seviyelerinde kalıntıya rastlandı. Nitrofuran AOZ kalıntı seviyelerine ilişkin frekans dağılımı Tablo- 20’de, belirlenen kalıntı konsantrasyonları ise Şekil- 13’de sunulmaktadır.

Tablo- 20: Tavuk karaciğer örneklerinde nitrofuran AOZ kalıntı düzeylerinin dağılımı

Nitrofuran AOZ Seviyeleri (ng/kg)	Örneklerin Sayısı	Sıklığı (%)
<LOD^a	79	87.8
100-115	2	2.2
115-130	4	4.4
130-145	3	3.3
>145	2	2.2

^aTespit limiti: 100 ng/kg



Şekil- 13: ELISA ile analiz edilen tavuk karaciğerinde nitrofuran AOZ pozitif örneklerin sayısı ve kalıntı düzeyleri

LC-MS/MS Analizi

But ve göğüs örneklerinde kloramfenikol kalıntılarının varlığını belirlemek ve doğrulamak amacıyla 2002/657/EC'ye göre valide edilen LC-MS/MS tekniğinden yararlanıldı. $CC\alpha$ 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $CC\beta$ 0.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$, geri kazanım oranı (recovery, doğruluk) % 97.33-104 aralığında, RSD (% CV) % 2-4 oranında ve linearite aralığı 0-0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak belirlendi. Toplam ölçüm belirsizliği 0.63841 olarak tespit edildi. Spesifikasyon (özgünlük) için 20 adet blank (kör) numunesi ile çalışıldı. Seçicilik (selectivity) için, kromotogramlarda bilinen hiçbir madde ile benzerlik gösteren iyon tespit edilmedi. Ancak bazı numunelerde 257 iyonu geldiği görüldü. Sağlıkta tespitinde, Youden-Plan araştırma aracılığıyla, kolon sıcaklığı 30°C'den 40°C'ye çıkarıldığında performansta bir değişiklik olmadığı ancak RT (pik zamanı)'nin 8.34'ten 8.00'e geldiği görüldü. Mobil faz asitliğe kaydığında RT'nin 8.00'dan 7.80'e kaydığı görüldü. Performansta bir değişiklik olmadı. Kullanılan standartların zaman içerisinde ve farklı ısı derecelerinde kontrolü yapılarak stabiliteleri kontrol edildi.

Validasyon sonuçlarına ilişkin veriler ekler kısmında sunulmaktadır.

ELISA analizi sonucu kloramfenikol kalıntılarının varlığı yönünden pozitif olarak değerlendirilen 15 örnekten 2'si (259 ve 361 ng/kg) ve negatif olarak değerlendirilen 45 örnekten 1'i (150 ng/kg) LC-MS/MS ile pozitif bulundu.

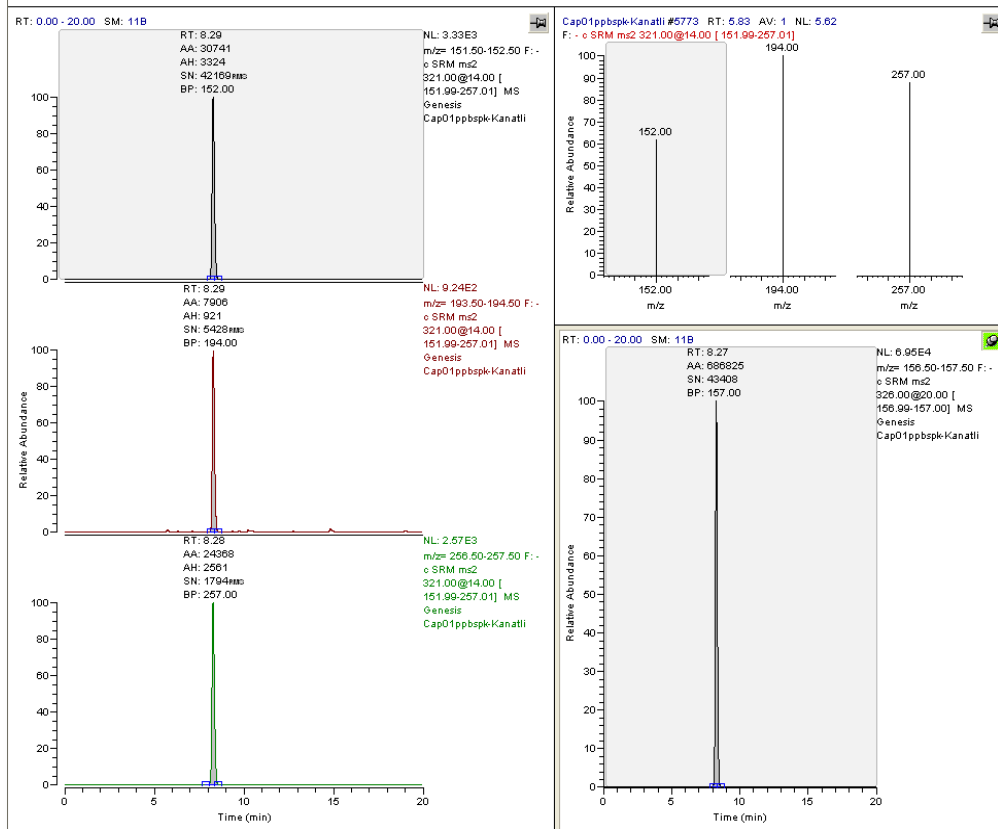
Tablo- 21: ELISA ve LC-MS/MS ile kloramfenikol kalıntısı yönünden analizleri yapılan toplam örnek sayıları ve kalıntı düzeyleri

ELISA analizi		LC-MS/MS analizi			
Kalıntı düzeyi (ng/kg)	Örnek sayısı	Kalıntı düzeyi (ng/kg)	Negatif örnek sayısı	Kalıntı düzeyi (ng/kg)	Pozitif örnek sayısı
<12.5	45 ^a	<100	44	>100	1
12.5-100	14 ^b	<100	13	>100	1
>100	1 ^b	<100	-	>100	1

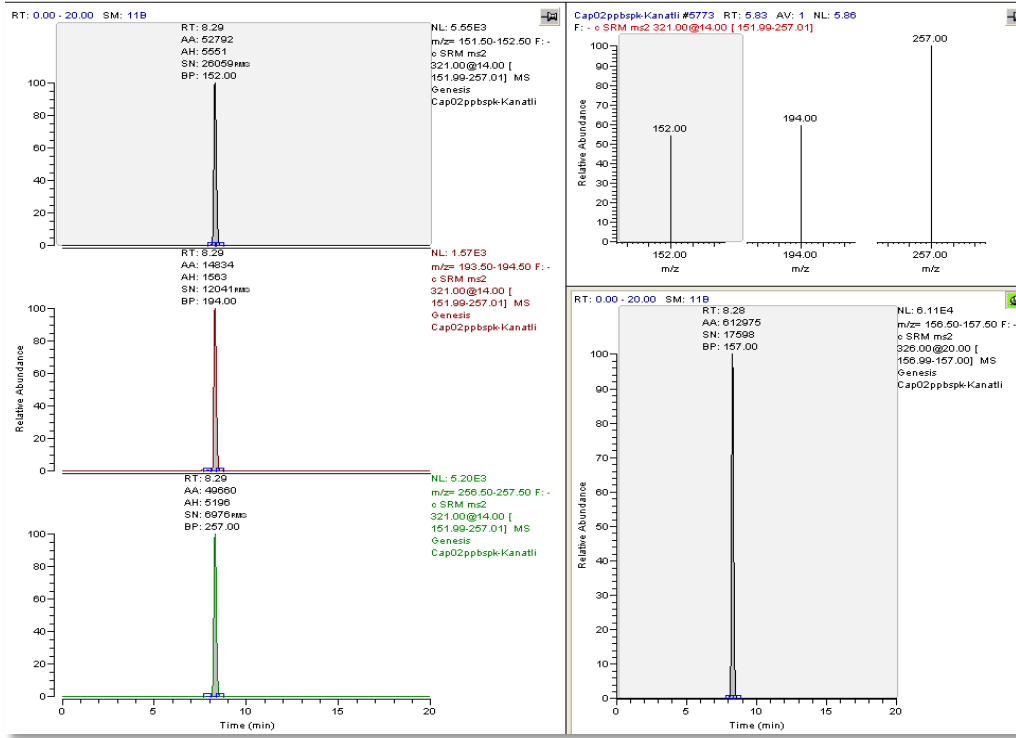
^aELISA negatif örnekler

^bELISA pozitif örnekler

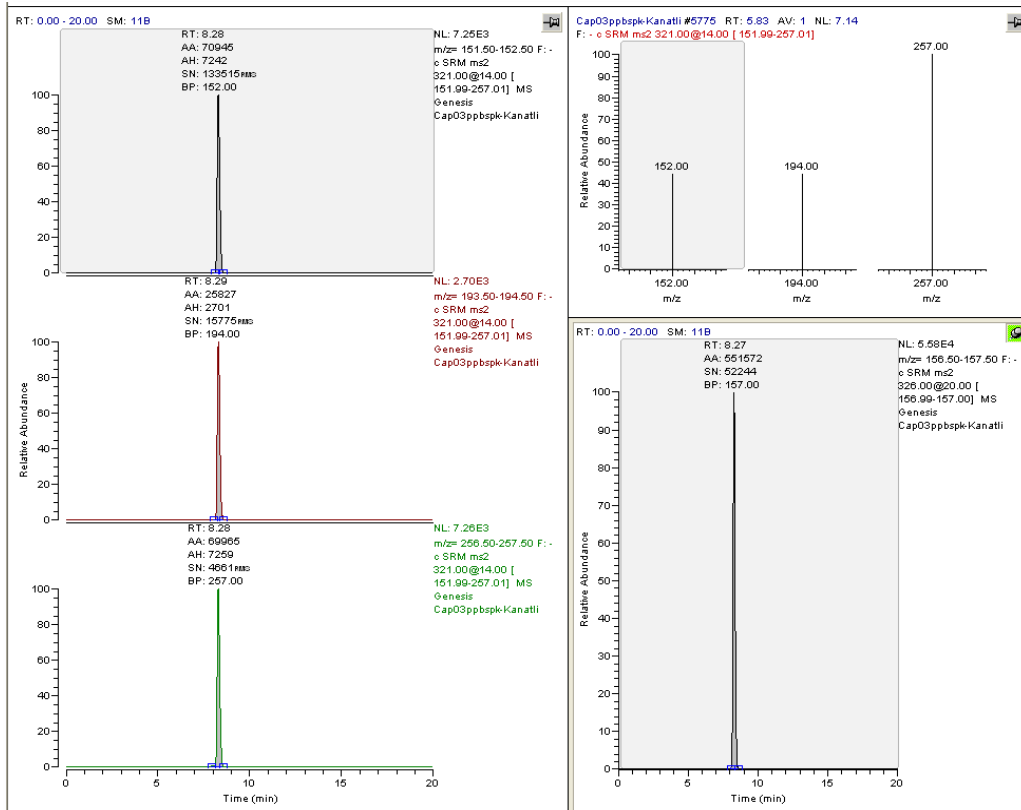
Sonuçların hesaplanmasında, blank (kör) dokulara 3 farklı konsantrasyonda (100 ng/kg, 200 ng/kg ve 300 ng/kg) dış standart yüklenmiş örnekten elde edilen regresyon (değişkenler arası ilişki) analizi grafiğinden yararlanıldı (Şekil- 14, Şekil- 15, Şekil- 16, Şekil- 17 ve Tablo- 22).



Şekil- 14: 100 ng/kg seviyesinde yüklenmiş blank (kör) numunesinin kromatografisi



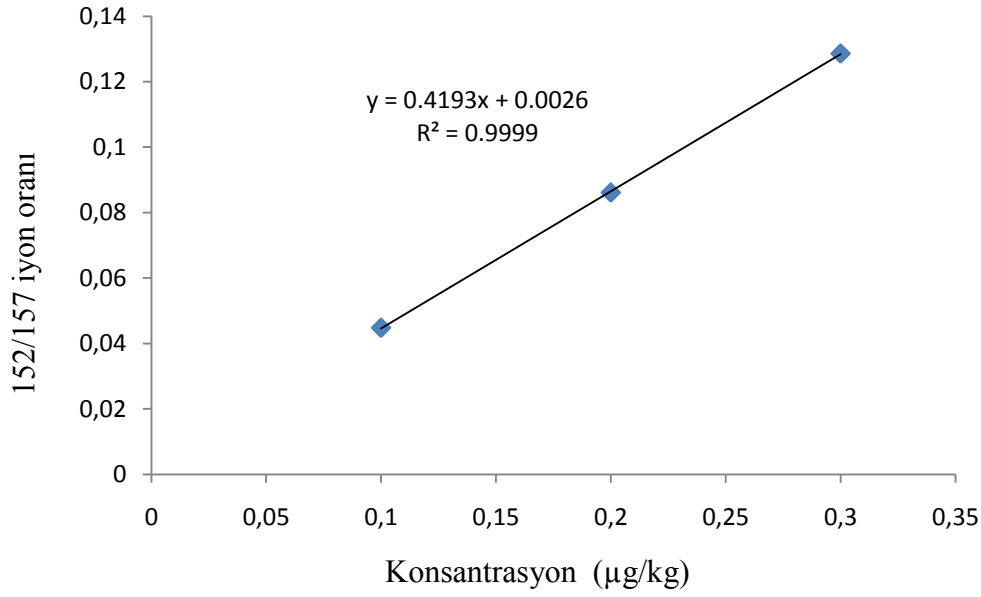
Şekil- 15: 200 ng/kg seviyesinde yüklenmiş blank (kör) numunesinin kromatografisi



Şekil- 16: 300 ng/kg seviyesinde yüklenmiş blank (kör) numunesinin kromatografisi

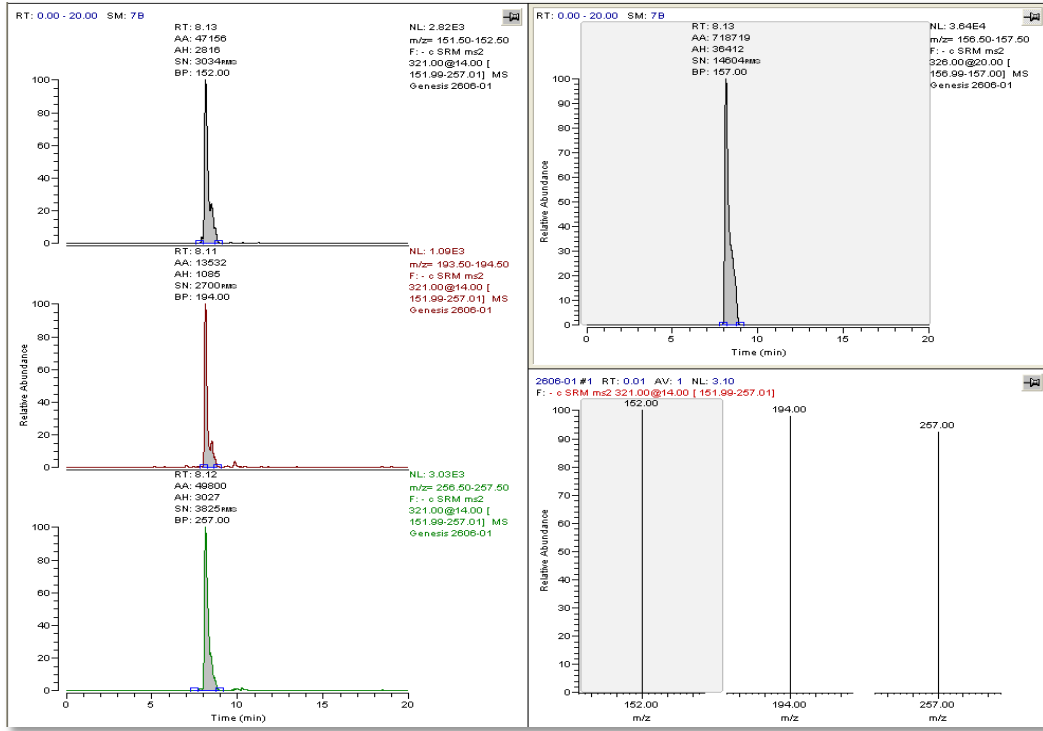
Tablo- 22: Regresyon analizi grafiği hesaplama tablosu

Konsantrasyon (µg/kg)	152 iyonu alanı	İç standart (157 iyonu) alanı	152/157 iyonu
0.1	30741	686825	0.044758
0.2	52792	612975	0.086124
0.3	70945	551572	0.128623

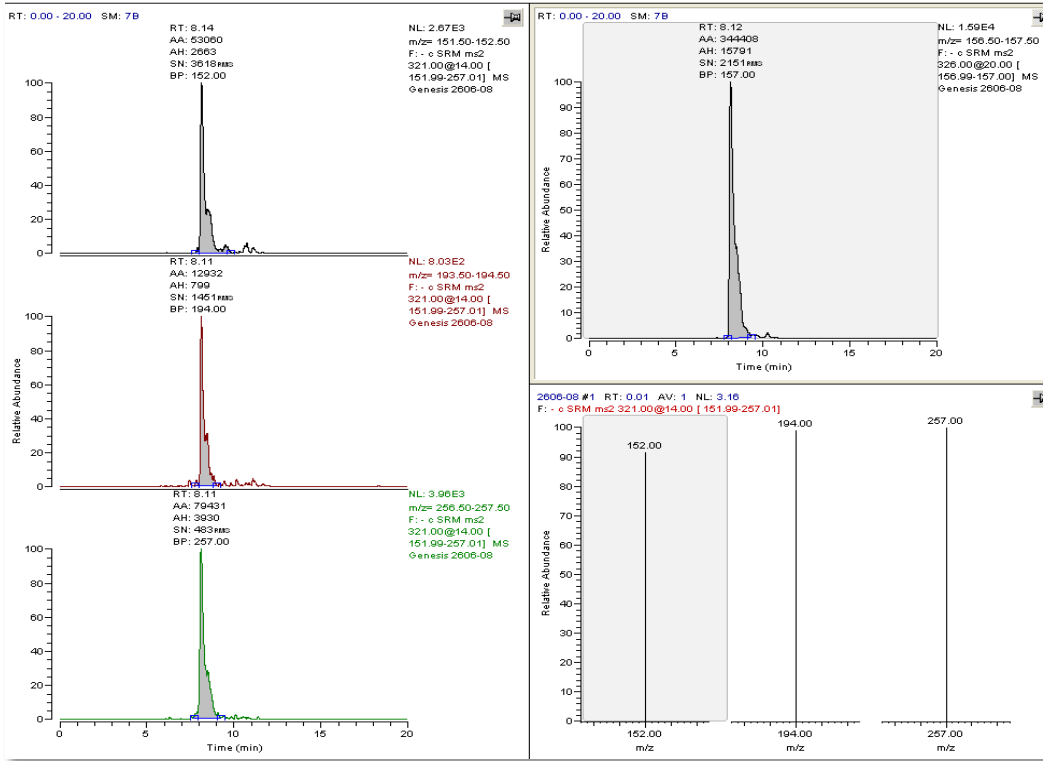


Şekil- 17: 0.1 µg/kg, 0.2 µg/kg ve 0.3 µg/kg seviyelerinde yükleme sonucu elde edilen regresyon analizi grafiği ve R^2 sonucu

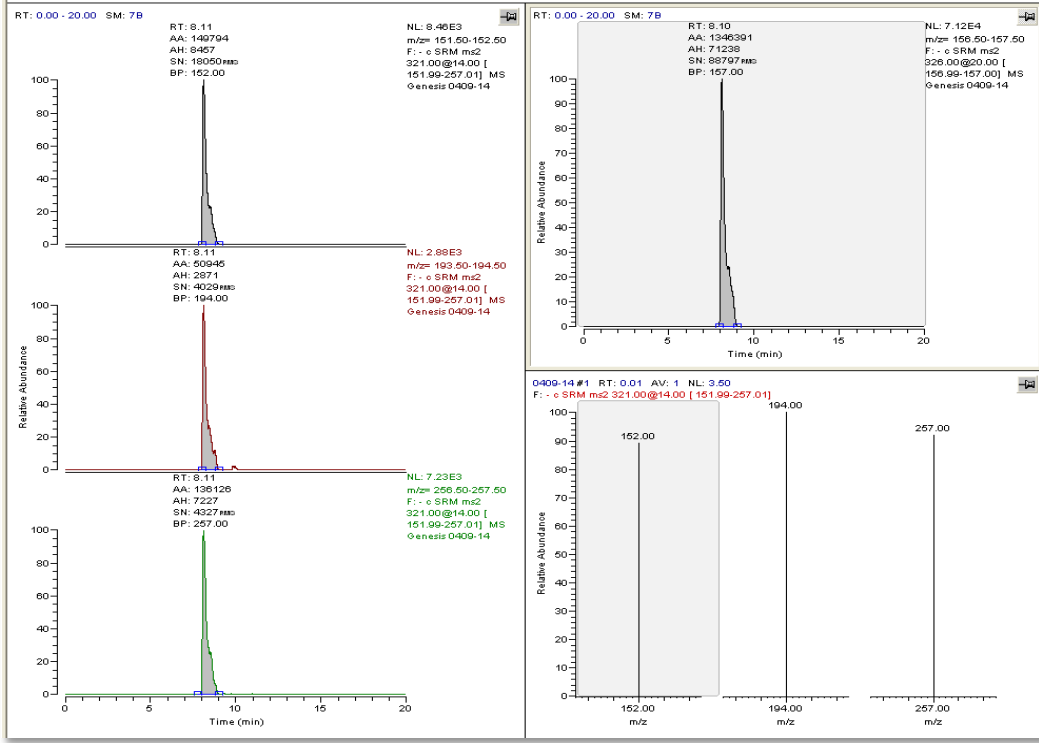
LC-MS/MS ile pozitif sonuç alınan örneklere ilişkin kromotogramlar Şekil- 18, Şekil- 19 ve Şekil- 20'de verilmektedir.



Şekil- 18: Kloramfenikol yönünden ELISA negatif örneğin LC-MS/MS ile 150 ng/kg olarak ölçülen kromatografisi



Şekil- 19: Kloramfenikol yönünden ELISA pozitif (30 ng/kg) örneğin LC-MS/MS ile 361 ng/kg olarak ölçülen kromatografisi



Şekil- 20: Kloramfenikol yönünden ELISA pozitif örneğin (226.22 ng/kg) LC-MS/MS ile 259 ng/kg olarak ölçülen kromatografisi

Tavuk karaciğer örneklerinde nitrofuran AOZ kalıntılarının varlığını belirlemek ve doğrulamak amacıyla 2002/657/EC'ye göre valide edilen LC-MS/MS tekniğinden yararlanıldı. CC α 1.07 μ g/kg, CC β 1.13 μ g/kg, geri kazanım oranı % 86-88.3 aralığında, RSD (% CV) % 2.5-3.8 aralığında ve linearite aralığı 0.5-2 μ g/kg olarak belirlendi. Toplam ölçüm belirsizliği 0.5456 olarak tespit edildi. Spesifiklik için nitrofuran grubu antibiyotik bileşiği içermediği bilinen 20 farklı örnek analiz edilerek, piklerin çıkış zamanlarında herhangi bir interfere yapıp yapmadığına bakıldı. Sonuçta herhangi bir interferasyon gözlenmedi. Bu numuneler validasyon çalışmalarında kullanıldı ve tamamına yükleme yapılarak nitrofuran bileşiklerinin tanımlandığı görüldü. Seçicilik için kromatogramlarda bilinen hiçbir madde ile benzerlik gösteren iyon tespit edilmedi. Kullanılan standartların zaman içerisinde ve farklı ısı derecelerinde kontrolü yapılarak stabiliteleri kontrol edildi.

Validasyon sonuçlarına ilişkin veriler ekler kısmında sunulmaktadır.

ELISA'da nitrofuran kalıntılarının varlığı yönünden pozitif sonuç alınan bir örnek (1027.83 ng/kg), LC-MS/MS ile de pozitif (1291 ng/kg) olarak değerlendirildi.

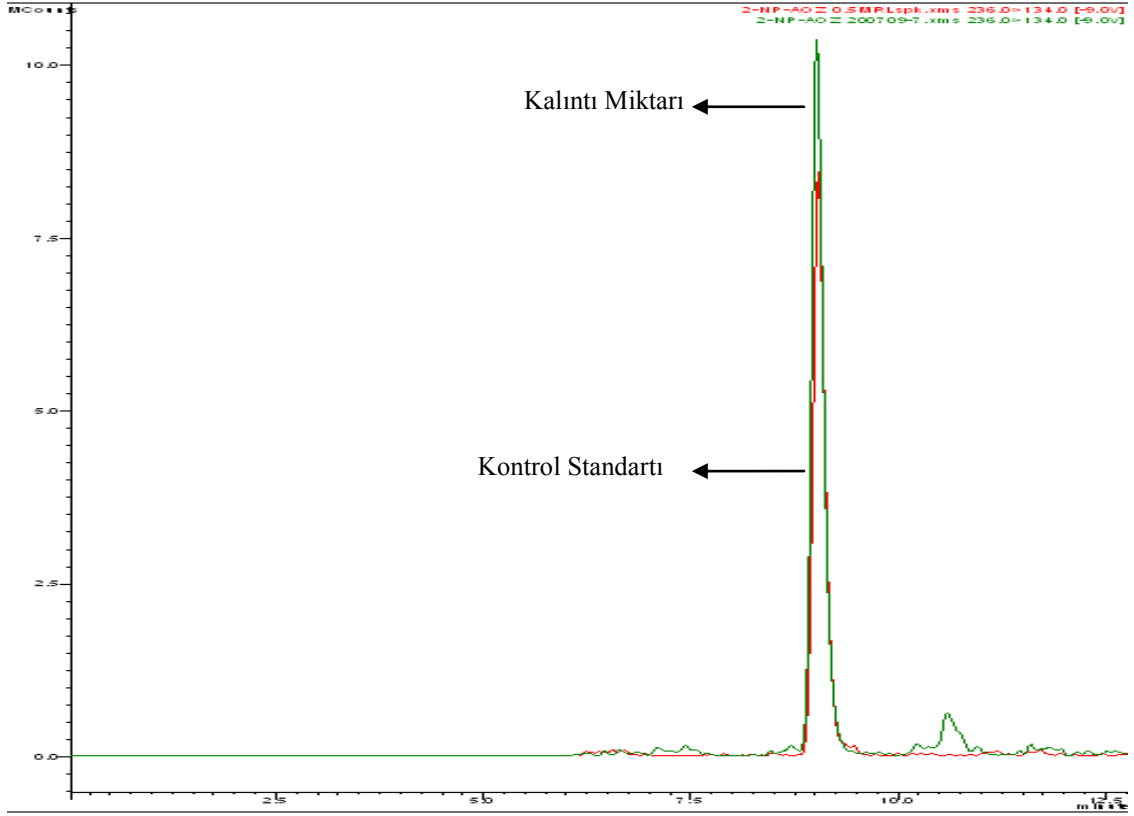
Tablo- 23: ELISA ve LC-MS/MS ile nitrofuran kalıntısı yönünden analizleri yapılan toplam örnek sayıları ve kalıntı düzeyleri

ELISA analizi		LC-MS/MS analizi			
Kalıntı düzeyi (µg/kg)	Örnek sayısı	Kalıntı düzeyi (µg/kg)	Negatif örnek sayısı	Kalıntı düzeyi (µg/kg)	Pozitif örnek sayısı
<0.1	8 ^a	<1.07	8	>1.07	-
>0.1	1 ^b	<1.07	-	>1.07	1

^aELISA negatif örnekler

^bELISA pozitif örnekler

LC-MS/MS analizi sonucunda pozitif sonuç veren örneğin dış standart ile karşılaştırmalı olarak verilen kromatogram Şekil- 21'de sunulmaktadır.



Şekil- 21: Nitrofuran AOZ yönünden LC-MS/MS ile pozitif (1291 ng/kg) sonuç alınan örneğin dış standart ile karşılaştırmalı kromatogramı (yeşil pik: numunedeki kalıntı, kırmızı pik: kontrol standardı)

Retensiyon zamanı (RT)	: 9.018
Alan (pik alanı)	:1.061e+8
Yükseklik	:1.058E+7
Regresyon denklemleri	$y=0.1615x+0.238$
R^2	: 0.9986
RSD (%CV, tekrarlanabilirlik)	: % 9.826
Sonuç	: 1.291 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1291 ng/kg)

Tavuk eti ve karaciğerinde kloramfenikol ve nitrofuran AOZ kalıntıları için ELISA ve LC-MS/MS, enrofloksasin/siprofloksasin kalıntısı için ELISA teknikleri ile elde edilen bulgular Tablo- 24'te gösterilmektedir.

Tablo- 24: Kalıntı yönünden araştırılan tavuk eti ve karaciğerine ait genel durum

Kalıntı	Tür	Yasal limit ^a	ELISA numune sayısı ^b	LC-MS/MS numune sayısı ^c	ELISA pozitif	LC-MS/MS pozitif ^d
Enrofloksasin/siprofloksasin	But ve göğüs	100 µg/kg	180	-	12 (% 6.6)	-
Kloramfenikol	But ve göğüs	0 tolerans	180	60	15 (% 8.3)	3 (% 5)
Nitrofuran AOZ	Karaciğer	0 tolerans	90	9	11 (% 12.2)	1 (% 11.1)

^a2002/30 Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği'ne göre belirtilen yasal kalıntı limiti

^bELISA analizi yapılan numune sayısı

^cLC-MS/MS ile doğrulamaya tabi tutulan numune sayısı

^dLC-MS/MS doğrulaması sonucu tespit edilen pozitif numune sayısı

^eLC-MS/MS ile doğrulama yapılmadı

TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemiz, tavuk etinin de dahil olduğu hayvansal gıda temininin çoğunu entansif hayvancılıktan sağlamaktadır. Entansif hayvancılıkla uğraşan üreticimiz de kısa zamanda yüksek verimler elde etmek istemektedir. Bu anlamda kanatlı yem katkıları kanatlı endüstrisinin ayrılmaz bir parçasıdır (182). Katkıların birçoğu kanatlıların tedavisinde ve profilaktik açıdan önemli rol oynarlar. Ama bu katkıların özellikle de ilaç niteliğinde olanların yanlış kullanımları tüketiciler için önemli problemlere yol açabilir (183). Üreticimizin yüksek verim elde etmek ve büyütme faktörü olarak kullandıkları hormon, ilaç ve antibiyotikler için belirlenen yasal zorunluluklara uyup uymadıkları da tam olarak denetlenememektedir. Bu bağlamda, entansif üretim içinde kullanılan teknikler çoğu zaman hayvan haklarını ve sağlığını, dolayısıyla da insan sağlığını ikinci plana atmaktadır (34).

Dünya üzerinde üretilen veteriner ilaçlarının % 30'u domuz sağlığında, % 27'si sığır ve % 26'sı da kanatlı yetiştiriciliğinde kullanılmakta olup, bunların bir kısmı gıdalarla biz tüketicilere geçmekte, çevredeki toprak ve su kaynaklarına ulaşan bir kısım antibakteriyel ilaçlar da toprak omurgasızları, algler, balıklar ve bitkiler üzerinde toksik etkiler oluşturabilmektedir (49, 184, 185).

Bilindiği gibi, gıda üretiminde kullanılan hayvanlara uygulanan ve bunlardan elde edilen süt ve et gibi ürünlerde bulunan ilaç kalıntıları, birçok ülkede önemli bir problemdir (186-188). Ülkemizde de kontrol mekanizmalarının yetersizliği ve yetiştiricinin bu konuda bilgisizliği insan sağlığını riske sokmaktadır. Tüm dünyada bu konu ciddiyle ele alınıp, sağlıklı ve kolay kontrol mekanizmaları geliştirilirken ülkemizde bu konuda etkili olarak öne çıkan herhangi bir yaptırımın olmaması son derece üzücüdür.

Bu üretimin çıktıları olan hayvansal ürünlerde bulunan antibiyotik kalıntılarının, insan sağlığı üzerindeki istenmeyen etkilerinden dolayı, hayvansal dokularda ve biyolojik sıvılarda analizlerinin yapılması giderek önem kazanmıştır (189). Hayvansal besinlerin antibiyotik kalıntılarında arındırılabilmesi için uygulanması gereken "yasal bekletme süresi", ilaçla tedavinin durdurulması ve besinlerde bulunmasına izin verilen kalıntı miktarı sınırlarının belirlenmesi amacıyla yapılan analizler, gıda güvenliği ve toplum sağlığı yönünden yapılan çalışmalara katkı sağlamaktadır (190).

Çalışmamız da karşı karşıya olduğumuz bu tehlikeleri destekler nitelikte olup edinilen bulgular aşağıdaki gibidir;

180 adet tavuk eti ve 90 adet tavuk karaciğerinin ELISA ile analizleri sonucunda 10 adet (% 11.1) but eti ve 5 adet (% 5.5) göğüs etinin (LOD) tespit edilebilir limitlerin üzerinde kloramfenikol kalıntısı içerdiği belirlendi. Aynı örneklerde enrofloksasin/siprofloksasin kalıntı düzeyi, but etlerinin 4 adeti (% 4.4) ve göğüs etlerinin de 8 adetinde (% 8.9) tespit edilebilir limitlerin üzerinde bulundu. Karaciğer örneklerinin 11 adeti (% 12.2) nitrofuran AOZ kalıntıları için pozitif sonuç verdi. 15 adet ELISA pozitif ve 45 adet ELISA negatif örnek, kloramfenikol bakımından LC-MS/MS ile doğrulamaya maruz bırakıldı. Pozitif örneklerden 2' si ile negatif örneklerden 1'inin LC-MS/MS ile bu antibiyotiğin kalıntılarını içerdiği (150-361 ng/kg) tespit edildi. 1 adet ELISA pozitif ve 8 adet ELISA negatif örnek de, nitrofuran AOZ bakımından LC-MS/MS ile doğrulamaya maruz bırakıldı. ELISA pozitif 1 adet örneğin, (negatif örneklerin hiçbirinin) LC-MS/MS ile bu antibiyotiğin kalıntılarını içerdiği (1291 ng/kg) tespit edildi.

1994'te Ankara'da Akar (191) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, 175 tavuk etinin 4 adetinde 0.2-0.6 mg/kg oranında kloramfenikole rastlanılmıştır. İnce tabaka kromatografi ve biyotografi yöntemlerinin kullanıldığı çalışmada mg/kg düzeyinde sunulan bu değerler bizim çalışmamızdaki tespit limitlerinin çok üstündedir.

Yüksek'in (192) tavuk doku örneklerini de kapsayan çalışmasında, piyasadan toplamış olduğu 50 adet tavuk örneği dokularında disk diffüzyon ve üçlü plak yöntemi kullanmış ve kloramfenikol kalıntısına rastlanılmamıştır.

Arjantin'de broyler etlerinde florokinolon grubu antibiyotik (siprofloksasin, enrofloksasin, balofloksasin) kalıntılarının tespit edilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, ortalama % 77.47 enrofloksasin, % 87.7 siprofloksasin ve % 96.67 balofloksasin kalıntısı 0.01-0.1 µg/g düzeylerinde saptanmıştır (193).

Tahran'da (İran), Salehzadeh ve ark (48) enrofloksasin yönünden yaptıkları araştırmaların, 90 ayrı çiftlikten toplam 270 tavuk eti, karaciğer ve böbrek örneği toplamışlardır. Etlerin 8 (% 8.88)'i, karaciğerlerin 12'si (% 13.33) ve böbreklerin 22'si (%

24.44) MKL değerlerinin üzerinde sonuç vermiştir. Kas, karaciğer ve böbrekte bulunan kalıntılardan ortalama düzeyleri de sırasıyla 18.32, 18.34 ve 26.06 ng/g olarak bildirilmiştir.

Schneider ve ark. (194) sığır ve tavuk karaciğerlerinde bir florokinolon olan danofloksasin kalıntılarında rastlamışlardır.

Dünya’da yapılan birçok çalışma, çeşitli ülkelerde tavuk etlerinin nitrofuran metabolitleri ile kontamine olduğunu ortaya koymuştur (149).

Araştırmaların sonuçları kullanımı yasaklı olan ve yasalarla sınırlanmış olan bu antibiyotiklerin çıkarılan yasalara rağmen uzun srelerden bu yana hala kullanıldığını ve kullanımları maksimum kalıntı limitleri verilerek sınırlandırılmış olanların da üreticiler tarafından gıda değeri taşıyan her türdeki hayvanda bilinçsizce kullanıldığını göstermektedir.

Gang ve ark. (195)’nin Çin’de farklı kümeslerden tavuk dışkaları olarak yaptıkları bir çalışmada, 4 adet tavuk dışkısının 5.7 ile 13.4 mg/kg arasında değişen düzeylerde kloramfenikol kalıntısı içerdiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmada 0.3 ile 3 mg/kg düzeylerinde siprofloksasin tespit edilmiştir. Furazolidon da, tavuk gübrelerinden tespit edilen antibiyotiklerdendir. Aynı çalışmada tavuk gbrelerinde furazolidon için kalıntı düzeyleri 0.9 ile 15.6 mg/kg aralıklarında olduğu bildirilmiştir.

Cho ve ark. (196) tavukların sindirim ve solunum sistemindeki enfeksiyonların sağaltımında kullanılan enrofloksasinin kalıntılarını araştırdıkları çalışmalarında, Kore Cumhuriyeti’nde topladıkları 120 tavuk yumurta örneğinin 3 adetinde 0.43 ile 1.02 mg/kg arasında değişen düzeylerde enrofloksasin kalıntısı saptamışlardır.

Bergner-Lang ve ark. (197) 517 böbrek, 312 et ve karaciğer örneğinin sırasıyla 223’ (% 43), 135’i (% 43) ve 18’inde (% 45) antibiyotik kalıntılarında rastladıklarının ve örneklerin 151’inin (10-13.5 μ g/kg) tetrasiklin, 60’ının (0.5-100 μ g/kg) kloramfenikol ve 2’sinin (12-250 μ g/kg) kinolon antibiyotiklerinin kalıntılarında taşıdığını bildirmişlerdir.

İngiltere Veteriner İlaçları Direktörlüğü’nn yıllık yayınladığı tarama sonuçlarına göre de ülke içinde tüketime sunulan gıdalarda tespit edilebilen antibiyotik kalıntılarında ilişkin sonuçlar aşağıda görülmektedir (167, 198, 199).

YIL	TÜR	NEGATİF	<MKL*	>MKL*
1996	Kırmızı et ve Ürünleri	% 99.20	-	% 0.12
1997	Kırmızı et ve Ürünleri	% 99.50	-	% 0.13
	Kırmızı et ve Ürünleri	% 99.90	% 0.07	% 0.05
1998	KANATLI VE ÜRÜNLERİ	% 98.80	% 0.05	% 1.20
	Balık	% 99.50	-	% 0.50
	Yumurta	% 97.50	-	% 2.50
	Süt	% 99.80	-	% 0.20
	Kırmızı et ve Ürünleri	% 99.95	% 0.03	% 0.02
1999	KANATLI VE ÜRÜNLERİ	% 99.30	% 0.10	% 0.60
	Balık	% 100	-	-
	Yumurta	% 96.90	% 2.70	% 0.40
	Süt	% 100	-	-
	Kırmızı et ve Ürünleri	% 99.86	% 0.06	% 0.07
2000	KANATLI VE ÜRÜNLERİ	% 99.10	% 0.45	% 0.46
	Balık	% 96.70	-	% 3.30
	Yumurta	% 97.60	% 1.20	% 1.20
	Süt	% 100	-	-

*Maksimum kalıntı limiti

Al Pavlov ve ark. (6) Bulgaristan'daki 2 kesimhanede, tavuk etleri ve sakatatlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, kışın % 4 oranında göğüs etinde, % 17 oranında karaciğer dokusunda, yazın ise, 30 adet kas dokuda antibiyotik kalıntısına hiç rastlamazken, % 7.5 oranında karaciğerde antibiyotik kalıntısı tespit etmişlerdir. 2. kesimhanede yaptıkları tarama sonucunda, kışın 25 ve yazın 15 adet kas dokusunda rastlamadıkları kalıntıları, sırasıyla % 6.45 ve % 4.4 oranında karaciğer örneklerinde belirlemişlerdir.

Nijerya'da Kabir ve ark. (8) 200 ticari yumurta ve kesimhanelerden alınan 378 tavuk feçesini disk difüzyon mikrobiyel inhibisyon metodu ile incelemiş ve 10 farklı kümeden 9'un da en az bir kez antibiyotik kullanıldığını bildirmişlerdir. 9'unun da antibakteriyelleri profilaksi, sağaltım veya her ikisini sağlamak amacıyla kullandıklarını bildirmişlerdir. Kümeslerin hiçbirinde ilaçların kullanım ve geri çekilme sürelerinin takip edilmediği anlaşılmıştır. 2 adet yumurta (% 1) ve 82 feçes örneğinde (% 21.8) antibiyotik kalıntısı saptanmıştır. 178 broiler içinde 59'unda (% 33.1) antibiyotik kalıntısı tespit edilerek, antibakteriyel kalıntı insidensi diğer ırk piliçlere göre daha çok gözlenmiştir.

Öbekçi (200) Tarım ve Köyişleri Bakanlığı bünyesinde yürütülmekte olan “ Kanatlı Etlerinde Ulusal Kalıntı İzleme Genelgesi” doğrultusunda Türkiye’nin değişik illerinden temin ettiği 200 tavuk eti ve 200 tavuk karaciğer örneğini HPLC tekniği ile tetrasiklin grubu antibiyotik (tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklin) kalıntıları yönünden incelemiştir. Tavuk etlerinde % 8.1 oranında oksitetrasiklin, % 7 tetrasiklin ve % 5.5 klortetrasiklin; tavuk karaciğerlerinde ise % 74 oranında oksitetrasiklin, % 47 tetrasiklin ve % 5.5 klortetrasiklin kalıntısı bulunduğunu bildirmiştir. Kalıntı düzeylerinin, pozitif sonuç veren numunelerde tolerans limitlerinin altında bulunduğu belirtilmiştir.

Tahran’da (İran) (15), 2001 Ağustosan başlayarak 1 yıl süre ile kas, karaciğer ve böbrekler üzerinde yapılan HPLC ile oksitetrasiklin çalışmasına göre, % 27.77 oranında kasta, % 95.55 oranında karaciğerde ve % 18.88 oranında da böbreklerde MKL seviyelerinin üzerinde kalıntıya rastlanmıştır. Kalıntıların düzeyi 88.75, 576.657 ve 517.56 ng/gr olarak belirtilmiştir.

Shareef ve ark. (201) Irak’ta yaptıkları bir çalışmada, 25 piliç karaciğer ve göğüs etinin 7’sini (% 28) sulfadiazin ve oksitetrasiklin, but etlerinin 7’sini (% 28) oksitetrasiklin, 4’ü (% 16) sulfadiazin yönünden pozitif bulmuşlardır.

Croubels ve ark. (202) 52 domuz böbreğinden 7’sinde 600 ng/g ile 1265 ng/g arasında değişen düzeylerde doksisiklin, 1 örnekte 1127 ng/g oranında tetrasiklin, 6 adet sığır böbreğinde oksitetrasiklin, ki bir tane böbrekte diğerlerinden daha farklı olarak 2662 ng/g, 2 adet tavuk göğüs etinde doksisiklin ki, birinde 333 ng/g oranında tespit etmişlerdir.

Degroodt ve ark. (203) 600 et örneğinin 1’inde 4 µg/kg düzeyinde furazolidon (AOZ) kalıntısına rastlamışlardır. Yine aynı çalışmada 2000 et örneği kloramfenikol yönünden incelenmiş ve 10 adet örnekte 2-180 µg/kg arasında değişen kloramfenikol kalıntısına rastlamışlardır.

Erdoğdu ve ark. (204) 275 adet sığır ve koyun eti örneğinden 13’ünü Charm 2 ile tarama sonucunda tetrasiklin türevi antibiyotik kalıntıları yönünden şüpheli pozitif bulmuşlar, bunların HPLC-UV ile analizinde 11’inin MKL üzerinde (275-2540 µg/kg) 1 örnekte de MKL altında (32.4 µg/kg) bulmuşlardır.

Oruç ve ark. (50) yaptıkları çalışmada 2005 ve 2006 yılları arasında toplanan 60 adet sığır etinde ELISA metodu ile 4'ünde 25.2 µg/kg ile 31.4 µg/kg seviyeleri arasında streptomisin, 60 numunenin birinde 12 µg/kg oranında sulfamethazin kalıntısı tespit etmişlerdir.

2004 yılında geniş çapta yapılan bir taramanın sonuçları, 15 farklı Avrupa ülkesinden toplanan 1500 adet domuz eti numunesinden 12'sinde (% 0.8) nitrofuran metabolitlerine rastlanıldığı rapor edilmiştir. Yüksek oranda belirlenen metabolit AMOZ' olup, Portekiz'de 1 örnek nitrofuran AOZ (0.3 µg/kg), Yunanistan'da 1 örnek nitrofuran AOZ (3 µg/kg) yönünden pozitif olarak belirlenmiştir (205).

Ekim 2003'te "Avustralya Karides Yetiştiriciler Birliği" nin yaptığı bir araştırmada, AOZ birkaç karides örneğinde tespit edilmiş ancak diğer metabolitlere rastlanmamıştır (143).

Tittleimar ve ark.'nın (206) Kanada'da 1993-2004 yılları arasında su ürünlerinde LC-MS/MS ile 39 farklı veteriner ilacı varlığını araştırdıkları bir çalışmada, 1 adet balıkta 0.4 µg/kg oranında kloramfenikol, 4 adet karideste nitrofuran AOZ 0.5-2 µg/kg seviyelerinde, 3 adet karideste 0.3-0.73 µg/kg seviyelerinde enrofloksasin kalıntısına rastlanılmıştır.

İsviçre'de Edder ve ark.'nın (207) çalışmasında, Asya ülkeleri kaynaklı karideslerde nitrofuran metabolitlerine rastlanılmıştır. 157 örnekten 54'ünde 0.2-150 ng/g (ppb) oranında AOZ ve 0.3-86 ng/g oranında SEM metaboliti belirlendiği bildirilmiştir.

Polonya'da Rybinska ve ark.'nın (208) yaptığı bir çalışmada, çiğ sütlerin % 13-22'sinde, süt tozlarının % 11-20'sinde antibiyotik kalıntısına rastlanmıştır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Acet ve ark. (209) oksitetrasiklin (20 mg/kg) ve tetrasiklinin (50 mg/kg) ağız yoluyla broyler piliçlerine verilmesinden sonra, oksitetrasiklin kalıntılarının 0.32- 2.56 µg/gr düzeyinde yalnız böbreklerde, tetrasiklin kalıntılarının ise 0.080-0.240 µg/g düzeyinde plazma hariç tüm dokularda rastlandığını belirtmişlerdir.

Şubat 2002-2003 tarihleri arasında balık, su ürünleri ve kanatlılarda furazolidon daha seyrek olarak da furaltadon ve nitrofurazon ile ilgili bildirilen birçok kalıntı raporu bulunmaktadır. Tayland, Vietnam, Çin, Endonezya, Hindistan ve Bangladeş'te karideslerde

0.5-88 µg/kg arasında değişen düzeylerde bu kalıntılara rastlanmıştır. Çin, Hollanda, Brezilya ve Tayland'da incelenen kanatlı örneklerinde ise, 0.3-320 µg/kg arasında değişen düzeylerde nitrofuran kalıntıları saptanmıştır (210).

Konya'da 60 adet süt örneği ELISA tekniği ile test edilmiş örneklerin 28 (% 46.8) ve 40'ında (% 66.8) sırasıyla kloramfenikol ve tetrasiklin kalıntısı belirlenmiştir (211).

şanlı ve ark. ülkemizde yedi ticari firma ve 9 ayrı sütçülük biriminden elde ettikleri 75 çiğ ve 14 pastörize süttten oluşan toplam 89 örneği kloramfenikol kalıntısı yönünden taramış, İTK/biyootografik yöntemle 6 süt örneğinde 0.8-1.6 mg/kg arasında değişen düzeylerde kloramfenikol kalıntısı tespit etmişlerdir (212).

Bursa ve çevresinde toplanan 150 adet çiğ süt örneğinin 2'sinde, intertest yöntemi ile kloramfenikol kalıntısına rastlanmıştır (213).

Konya'da faaliyet gösteren çeşitli mandıralardan toplanan 61 süt örneğinde HPLC ile kloramfenikol yönünden analiz edilmiş ve 28 süt örneğinde kloramfenikol kalıntısı belirlenmiştir (214).

Ankara ve çevresinde süt sığırıcılığı yapılan kamu ve özel sektöre ait işletmelerden sağlanan 444 çiğ ve pastörize süt örneğinde intertest ve üçlü plak testleriyle kloramfenikol kalıntısı aranmış, intertest yöntemiyle 78 pozitif (% 17.56), 65 şüpheli (% 14.63), 301 negatif (% 67.79), *B. subtilis* ile yapılan üçlü plak yöntemiyle 24 (% 5.40) pozitif, 1 şüpheli (% 0.22), 419 (% 94.36) negatif sonuç elde edilmiştir. Bu farklılığın uygulanan yöntemden, örnek alma zamanından ve işletmelerden kaynaklandığı ifade edilmiştir (215).

Belçika'da üretilen ve ithal edilen ballar ile ilgili bir kalıntı çalışmasında (216), Belçika üretimi 72 örneğin 2'sinde (% 2.8) tetrasiklin bulunurken, 93 örneğin hiçbirinde kloramfenikol saptanmamıştır. İthal olarak ülkeye giren ve marketlerde satışa sunulan ürünlerden alınan örneklere göre ise, 98 örneğin 29 (% 29.6)'unda tetrasiklin ve 85 örneğin 40'ında (% 47.1) kloramfenikol kalıntısı tespit edilmiştir.

Avrupa’da laboratuvarlar arası yapılan bir çalışmada; çiğ sütte ELISA taramasında, ELISA test kitinin toplam yanlış pozitif oranı % 16.7 ve toplam yanlış negatif oranı % 2.2 olarak bildirilmiştir (160). Bu çalışma ile kıyaslama yaptığımızda bizim çalışmamız sonucunda, ELISA’nın LC-MS/MS’e göre kloramfenikol analizlerinde yanlış negatif oranı % 2.2, yanlış pozitif oranı da % 86.6 olarak tespit edilmiştir. Nitrofuran AOZ için ise uyguladığımız tarama ve doğrulama teknikleri arasında yanlışlık tespit edilmemiştir.

Kloramfenikol için duruma bakıldığında yanlış pozitif oranının belirtilen çalışmaya (160) ve bizim nitrofuran AOZ çalışmasına göre fazla olduğu görülmektedir. Aradaki bu durumun kloramfenikol için belirtilen ELISA tespit limiti ile LC-MS/MS karar limiti arasındaki farktan kaynaklandığını söyleyebiliriz. Ayrıca analizde kullanılan matriksin türü (tavuk etinde deri, yağ, sinir gibi kas dışı dokuların varlığı, matriks efekt), uygulanan ekstraksiyon sıvıları (etil asetatın kendi başına ELISA spektrometrede tespit edilebilir limitin üzerinde verdiği değerler) ve aranan kalıntıların çeşidine göre bu farkın oluşabileceğini söylemek de mümkündür. Nitrofuran AOZ için yanlış negatif ve pozitif değerlerin çalışmamızda 0 olarak tespit edilmesi bu antibiyotik için kromatografi ile doğrulamaya tabi tutulan örnek sayısının kloramfenikol için yapılan çalışmadaki numune sayısına (15 pozitif ve 45 negatif numune) göre çok az (9 adet, ELISA’daki tüm pozitiflerin götürülmemesi) olmasıdır denilebilir. ELISA sonucu elde edilen tüm pozitif numunelerin götürülmesi yanlış pozitiflik ve negatiflik için daha doğru sonuçlar alınmasını sağlayabilirdi.

Türkiye ve dünya’da incelenen değişik birçok metod ile yapılan tüm çalışmalarda tavuk eti ve ürünlerinde, Yüksek (192)’in çalışması hariç olarak farklı antibiyotik kalıntıları % 0.05 ile % 96.67 aralığında değişen oranlarda rastlanılmıştır.

Görüldüğü gibi, antibakteriyel ilaçların Türkiye ve diğer birçok ülkede bilinçsizce kullanımı ve dolayısıyla bıraktıkları kalıntılar yaygındır. Bu ilaçların, kontrolsüz ve bilinçsiz kullanımı sonucu organizmada ve organizma dışında, idrar, kan, atık sular ile diğer su kaynaklarına ve toprağa, dolayısıyla çevreye bulaşması kaçınılmazdır. Böylece, insan sağlığına yönelik olumsuz etkileri yanında antibakteriyel ilaçlara karşı dirençli bakteri suşlarının gelişimi ve oluşan bu direncin patojen bakterilere aktarılması riski de kaygı vericidir (217, 218).

Antibiyotiklerin kullanımı konusunda ülkemizde bakanlık, veteriner ilaç ve yem katkısı imalatçıları ile ithalatçıları, ecza depoları, eczaneler, veteriner hekimler, mesleki kuruluşlar, üniversiteler, ilgili sektörel sivil toplum kuruluşları ile işletme, çiftlik ve entegrasyon sahiplerine önemli görevler düşmektedir.

Gıda maddeleri içindeki antibiyotik kalıntılarının halk sağlığını etkileyen ciddi bir sorun olmasından dolayı, kümeslerde canlı hayvan kontrollerinin üretici işletmeler tarafından çok daha dikkatli bir şekilde uygulanması ve takip edilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. İşletmelerdeki ilgili bölüm ve kişilerin (kümes sahipleri ve kümes veteriner hekimleri) piliçlerde gelişmeye destek vermek ve oluşabilecek muhtemel hastalıkları engellemek amacı ile uyguladıkları kloramfenikol ve nitrofuran adlı yasak iki ilacı uygulamaktan vazgeçmeleri gerekmektedir. Ülkemizdeki yetkili merci olan Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın da denetlemelerini, gıda kalıntılarını izleme ve kullanımı yasaklanmış ilaçların da satışlarının ve uygulanmalarının önlenmesi yönünde daha çok arttırması gerekmektedir.

Halk sağlığı ile doğrudan ilgili olan ve son günlerde Avrupa Birliği uyum sürecinde gıda kontrol hizmetleri içinde önemli bir yer tutan tavuk etlerinde ve karaciğerinde antibiyotiklerin aranması ve özellikle enrofloksasin, kloramfenikol ve nitrofuranın ülkemiz özel sektöründeki saha uygulamalarında kullanımının yaygın olduğu düşüncesi, bizi bu çalışmayı gerçekleştirmeye yöneltmiştir. Kinolon grubunun insan sağlığı için önemli gıda patojenlerinde antibiyotik dirençliliğini arttırması, kloramfenikol ve tetrasiklinin kan anomalilerine yol açması ve nitrofuranın da özellikle teratojenik etkileri, halk sağlığı açısından bu antibiyotiklerin önemini ortaya koymaktadır.

Bu değerlendirmelerin ışığında gerçekleştirilmiş olan çalışmamızda ELISA analizi sonucu tavuk but ve göğüs eti örneklerinde kloramfenikol ile enrofloksasin/siprofloksasin, karaciğer örneklerinde ise nitrofuran AOZ antibiyotiklerinin değişik düzeylerde kalıntılara rastlanmıştır. Kloramfenikol ve nitrofuran AOZ'un gıda değeri olan hayvanlara uygulanması yasak ilaçlar listesinde yer almaları nedeniyle, örneklerde kalıntılara rastlanması yasal olmayan kullanımlarının söz konusu olduğunu ve halk sağlığına yönelik kanatlı eti ve karaciğeri kaynaklı potansiyel riski ortaya koymaktadır. Diğer taraftan gıda değeri olan hayvanlarda profilaktik ve terapötik amaçla kullanımlarına izin verilen enrofloksasin/siprofloksasin antibiyotiklerinin tavuk etlerinde tespit edilen kalıntıları MKL değerlerinin (100 µg/kg) altındadır. Buna rağmen, söz konusu antibiyotiğin vücuttan tamamen

atılamama ya da dokularda birikme ihtimalleri göz önüne alındığında, toksik ve alerjik etkilerinin görülebilmesi nedeniyle analiz edilen ürünlerin kesinlikle güvenli olduklarını ifade etmek söz konusu değildir.

ELISA analizi sonucu farklı düzeylerde örneklerde tespit edilen kloramfenikol ve nitrofuran AOZ antibiyotik kalıntılarını içeren ve içermeyen örneklerin LC-MS/MS ile doğrulanması sonucunda, farklı sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla bu sonuç yanlış ELISA pozitif ve negatif sonuçların alınabileceğini ve Avrupa Birliği'nce de önerilen LC-MS/MS gibi kütle spektrometre ile kombine bir teknikte immunolojik sonuçların doğrulanması gerektiğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak kanatlı endüstrisinde antimikrobiyal ajanların bilinçsizce ve kontrolsüz bir şekilde kullanımının ilgili kurum ve kuruluşlarca denetiminin sağlanması, yine satış öncesi et ve iç organların olası ilaç kalıntıları yönünden etkin immunolojik ve kromatografik tekniklerle araştırılmasının sağlanması ve sürdürülmesi gerekliliği açıktır.

EKLER

Kloramfenikol için Validasyon Sonuçları

Kalibrasyon Eğrileri Parametreleri

1. Gün

Standartlar ve kalibrasyon eğrisi

DATA	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Alan	Cap [µg/kg]
22_04_09					
	Cap	321>152	0	0,00000E+00	0
STD 1	Cap	321>194	0	0,00000E+00	
	Cap_d5	326>157	8.08	2.47217E+05	
	Cap	321>152	8.07	4.61150E+04	0.1
STD 2	Cap	321>194	8.07	1.60230E+04	
	Cap_d5	326>157	8.07	1.74628E+05	
	Cap	321>152	8.05	1.07029E+05	0.2
STD 3	Cap	321>194	8.05	4.09540E+04	
	Cap_d5	326>157	8.00	4.45140E+05	
	Cap	321>152	8.05	1.61295E+05	0.3
STD 4	Cap	321>194	8.05	6.21740E+04	
	Cap_d5	326>157	8.04	3.79697E+05	
	Cap	321>152	8.09	2.19806E+05	0.4
STD 5	Cap	321>194	8.09	8.44620E+04	
	Cap_d5	326>157	8.09	3.93240E+05	

Matriks ve kalibrasyon eğrisi -1-

DATA	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Alan	Cap [µg/kg]	s/n
22_04_09						
cap02	Cap	321>152	0	0.00000E+00	0.0	
Tavuk eti	Cap	321>194	0	0.00000E+00		
	Cap_d5	326>157	8.09	1.79595E+05		
cap11	Cap	321>152	8.08	2.69819E+04	0.1	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.08	8.46876E+03		N/A
	Cap_d5	326>157	8.08	1.91183E+05		
cap23	Cap	321>152	8.07	5.40826E+04	0.2	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.78807E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.07	2.03787E+05		
cap30	Cap	321>152	8.06	8.60068E+04	0.3	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	3.49500E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.06	1.35606E+05		
cap31	Cap	321>152	8.06	1.04692E+05	0.4	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	3.97487E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.06	1.39283E+05		

Matriks ve kalibrasyon eğrisi -2-

DATA	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Alan	Cap [µg/kg]	s/n
22_04_09						
cap06	Cap	321>152	0	0.00000E+00	0.0	
Tavuk eti	Cap	321>194	0	0.00000E+00		
	Cap_d5	326>157	8.09	1.98074E+05		
cap12	Cap	321>152	8.08	2.77701E+04	0.1	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.08	1.10097E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.08	1.95509E+05		
cap21	Cap	321>152	8.07	5.60073E+04	0.2	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	2.15477E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.07	2.04865E+05		
cap28	Cap	321>152	8.07	8.81257E+04	0.3	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	2.72616E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.07	1.98961E+05		
cap35	Cap	321>152	8.06	1.06087E+05	0.4	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	3.99209E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.06	1.76192E+05		

2. Gün

Standartlar ve kalibrasyon eğrisi

DATA	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Alan	Cap [µg/kg]
23_04_09					
STD1	Cap	321>152	0	0.00000E+00	0
	Cap	321>194	0	0.00000E+00	
	Cap_d5	326>157	8.08	2.33365E+05	
STD2	Cap	321>152	8.05	4.58710E+04	0.1
	Cap	321>194	8.05	1.38150E+04	
	Cap_d5	326>157	8.05	3.12955E+05	
STD3	Cap	321>152	8.06	1.00574E+05	0.2
	Cap	321>194	8.06	3.49450E+04	
	Cap_d5	326>157	8.06	1.74678E+05	
STD4	Cap	321>152	8.09	1.61699E+05	0.3
	Cap	321>194	8.09	6.21740E+04	
	Cap_d5	326>157	8.09	3.79697E+05	
STD5	Cap	321>152	8.05	2.05974E+05	0.4
	Cap	321>194	8.05	8.70180E+04	
	Cap_d5	326>157	8.05	3.96762E+05	

Matriks ve kalibrasyon eğrisi -1-

DATA 23_04_09	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Alan	Cap [µg/kg]	s/n
cap03	Cap	321>152	0	0.00000E+00	0	
Tavuk eti	Cap	321>194	0	0.00000E+00		
	Cap_d5	326>157	8.09	2.04949E+05		
cap17	Cap	321>152	8.07	2.80210E+04	0.1	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	9.36360E+03		N/A
	Cap_d5	326>157	8.07	2.31052E+05		
cap25	Cap	321>152	8.07	5.68249E+04	0.2	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	2.28228E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.07	1.02671E+05		
cap29	Cap	321>152	8.06	8.85313E+04	0.3	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	3.07725E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.06	1.12327E+05		
cap36	Cap	321>152	8.06	1.10435E+05	0.4	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	4.17397E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.06	1.31388E+05		

Matriks ve kalibrasyon eğrisi -2-

DATA 23_04_09	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Alan	Cap [µg/kg]	s/n
cap04	Cap	321>152	0	0.00000E+00	0	
Tavuk eti	Cap	321>194	0	0.00000E+00		
	Cap_d5	326>157	8.09	2.53576E+05		
cap10	Cap	321>152	8.08	2.80841E+04	0.1	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.08	8.24310E+03		N/A
	Cap_d5	326>157	8.08	2.22247E+05		
cap22	Cap	321>152	8.07	5.69193E+04	0.2	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	2.18209E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.07	1.66863E+05		
cap34	Cap	321>152	8.06	9.07873E+04	0.3	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	4.17193E+06		N/A
	Cap_d5	326>157	8.06	1.89253E+05		
cap37	Cap	321>152	8.06	1.17483E+05	0.4	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	3.53019E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.06	1.33081E+05		

3. Gün

Standartlar ve kalibrasyon eğrisi

DATA	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Alan	Cap [µg/kg]
24_04_09					
STD 1	Cap	321>152	0	0.0000E+00	0
	Cap	321>194	0	0.0000E+00	
	Cap_d5	326>157	8.08	2.52224E+05	
STD 2	Cap	321>152	8.08	4.4686E+04	0.1
	Cap	321>194	8.08	1.6754E+04	
	Cap_d5	326>157	8.08	1.31044E+05	
STD 3	Cap	321>152	8.06	9.7043E+04	0.2
	Cap	321>194	8.06	3.6883E+04	
	Cap_d5	326>157	8.06	3.61999E+05	
STD 4	Cap	321>152	8.06	1.5070E+05	0.3
	Cap	321>194	8.06	5.7262E+04	
	Cap_d5	326>157	8.06	1.20474E+05	
STD 5	Cap	321>152	8.07	1.9855E+05	0.4
	Cap	321>194	8.07	7.1539E+04	
	Cap_d5	326>157	8.07	3.54151E+05	

Matriks ve kalibrasyon eğrisi -1-

DATA	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Alan	Cap [µg/kg]	s/n
24_04_09						
cap07 Tavuk eti	Cap	321>152	0	0.00000E+00	0	
	Cap	321>194	0	0.00000E+00		
	Cap_d5	326>157	8.09	2.86299E+05		
cap13 Tavuk eti	Cap	321>152	8.07	2.89118E+04	0.1	N/A
	Cap	321>194	8.07	9.92384E+03		
	Cap_d5	326>157	8.07	1.71792E+05		
cap18 Tavuk eti	Cap	321>152	8.07	5.70381E+04	0.2	N/A
	Cap	321>194	8.07	2.05863E+04		
	Cap_d5	326>157	8.07	2.14877E+05		
cap32 Tavuk eti	Cap	321>152	8.06	9.29521E+04	0.3	N/A
	Cap	321>194	8.06	3.55509E+04		
	Cap_d5	326>157	8.06	2.12292E+05		
cap38 Tavuk eti	Cap	321>152	8.05	1.21072E+05	0.4	N/A
	Cap	321>194	8.05	4.12503E+04		
	Cap_d5	326>157	8.05	1.31721E+05		

Matriks ve kalibrasyon eğrisi -2-

DATA	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Alan	Cap [µg/kg]	s/n
24_04_09						
cap5	Cap	321>152	0	0.00000E+00	0	
Tavuk eti	Cap	321>194	0	0.00000E+00		
	Cap_d5	326>157	8.09	3.35582E+05		
cap16	Cap	321>152	8.07	3.09111E+04	0.1	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	9.59273E+03		N/A
	Cap_d5	326>157	8.07	2.85818E+05		
cap20	Cap	321>152	8.07	5.71360E+04	0.2	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	2.06046E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.07	1.45952E+05		
cap33	Cap	321>152	8.06	9.67366E+04	0.3	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	3.63654E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.06	1.99505E+05		
cap39	Cap	321>152	8.06	1.28217E+05	0.4	N/A
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	5.16990E+04		N/A
	Cap_d5	326>157	8.06	1.51629E+05		

Zamanlar ve İyonlar Arası Oran

1.Gün

Standartlar ve kalibrasyon eğrisi

DATA	Madde	İyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Oran (RT)	Alan	Cap [µg/kg]	Oran Ion2/Ion1
22_04_09							
STD 1	Cap	321>152	0		0.0000E+00	0.0	
	Cap	321>194	0		0.0000E+00		
	Cap_d5	326>157	8.08		2.4722E+05		
STD 2	Cap	321>152	8.07	1.00	4.6115E+04	0.1	
	Cap	321>194	8.07	1.00	1.6023E+04		0.35
	Cap_d5	326>157	8.07		1.7463E+05		
STD 3	Cap	321>152	8.05	1.01	1.0703E+05	0.2	
	Cap	321>194	8.05	1.01	4.0954E+04		0.38
	Cap_d5	326>157	8.00		4.4514E+05		
STD 4	Cap	321>152	8.05	1.00	1.6130E+05	0.3	
	Cap	321>194	8.05	1.00	6.2174E+04		0.39
	Cap_d5	326>157	8.04		3.7970E+05		
STD 5	Cap	321>152	8.09	1.00	2.1981E+05	0.4	
	Cap	321>194	8.09	1.00	8.4462E+04		0.38
	Cap_d5	326>157	8.09		3.9324E+05		

0.37

Zaman ve iyonlar arası oran kriterleri:

1.00 + 20%

0.45

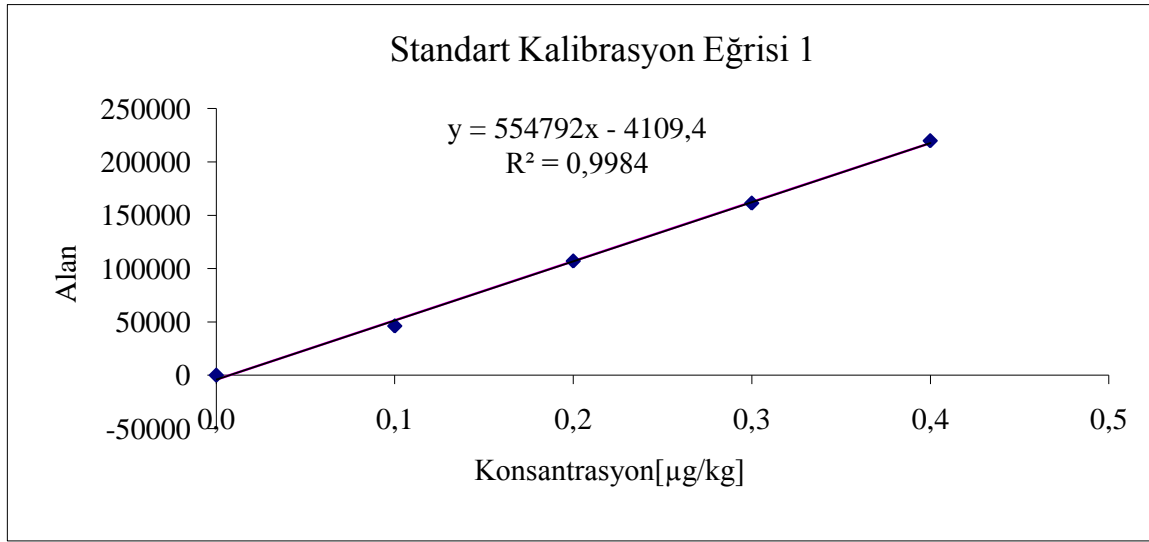
1.00 - 20%

0.30

Cap [µg/kg]	Alan	Regresyon Analizi
0.0	0	-4109
0.1	46115	51370
0.2	107029	106849
0.3	161295	162328
0.4	219806	217807

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	554792	-4109
sd=	12857	3149
R ² =	0.9984	
R=	0.9992	



DATA	Madde	Yon	Retensiyon Zamanı [dak]	Oran (RT)	Alan	Cap [µg/kg]	Oran Ion2/Ion1	Rec. %
22_04_09	cap02	Cap	321>152	0	0.0000E+00	0.0		
	Tavuk eti	Cap	321>194	0	0.0000E+00			
		Cap_d5	326>157	8.09	1.7960E+05			
	cap11	Cap	321>152	8.08	1.00	2.6982E+04	0.06	% 56
	Tavuk eti	Cap	321>194	8.08	1.00	8.4688E+03	0.31	
		Cap_d5	326>157	8.08		1.9118E+05		
	cap23	Cap	321>152	8.07	1.00	5.4083E+04	0.10	% 52
	Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	1.7881E+04	0.33	
		Cap_d5	326>157	8.07		2.0379E+05		
	cap30	Cap	321>152	8.06	1.00	8.6007E+04	0.16	% 54
	Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	3.4950E+04	0.41	
		Cap_d5	326>157	8.06		1.3561E+05		
	cap31	Cap	321>152	8.06	1.00	1.0469E+05	0.20	% 49
	Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	3.9749E+04	0.38	
		Cap_d5	326>157	8.06		1.3928E+05		

DATA	Madde	Iyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Oran (RT)	Alan	Cap [µg/kg]	Oran Ion2/Ion1	Rec.%
22_04_09								
cap06	Cap	321>152	0		0.0000E+00	0.00		
Tavuk eti	Cap	321>194	0		0.0000E+00			
	Cap_d5	326>157	8.09		1.9807E+05			
cap12	Cap	321>152	8.08	1.00	2.7770E+04	0.06		% 57
Tavuk eti	Cap	321>194	8.08	1.00	1.1010E+04		0.40	
	Cap_d5	326>157	8.08		1.9551E+05			
cap21	Cap	321>152	8.07	1.00	5.6007E+04	0.11		% 54
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	2.1548E+04		0.38	
	Cap_d5	326>157	8.07		2.0487E+05			
cap28	Cap	321>152	8.07	1.00	8.8126E+04	0.17		% 55
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	2.7262E+04		0.31	
	Cap	326>157	8.07		1.9896E+05			
cap35	Cap_d5	321>152	8.06	1.00	1.0609E+05	0.20		% 50
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	3.9921E+04		0.38	
	Cap	326>157	8.06		1.7619E+05			

2. Gün

Standartlar ve kalibrasyon eğrisi

DATA	Madde	Iyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Oran (RT)	Alan	Cap [µg/kg]	Oran Ion2/Ion1
23_04_09							
STD1	Cap	321>152	0		0.0000E+00	0.00	
	Cap	321>194	0		0.0000E+00		
	Cap_d5	326>157	8.08		2.3337E+05		
STD2	Cap	321>152	8.05	1.00	4.5871E+04	0.10	
	Cap	321>194	8.05	1.00	1.3815E+04		0.30
	Cap_d5	326>157	8.05		3.1296E+05		
STD3	Cap	321>152	8.06	1.00	1.0057E+05	0.20	
	Cap	321>194	8.06	1.00	3.4945E+04		0.35
	Cap_d5	326>157	8.06		1.7468E+05		
STD4	Cap	321>152	8.09	1.00	1.6170E+05	0.30	
	Cap	321>194	8.09	1.00	6.2174E+04		0.38
	Cap_d5	326>157	8.09		3.7970E+05		
STD5	Cap	321>152	8.05	1.00	2.0597E+05	0.40	
	Cap	321>194	8.05	1.00	8.7018E+04		0.42
	Cap_d5	326>157	8.05		3.9676E+05		

0.36

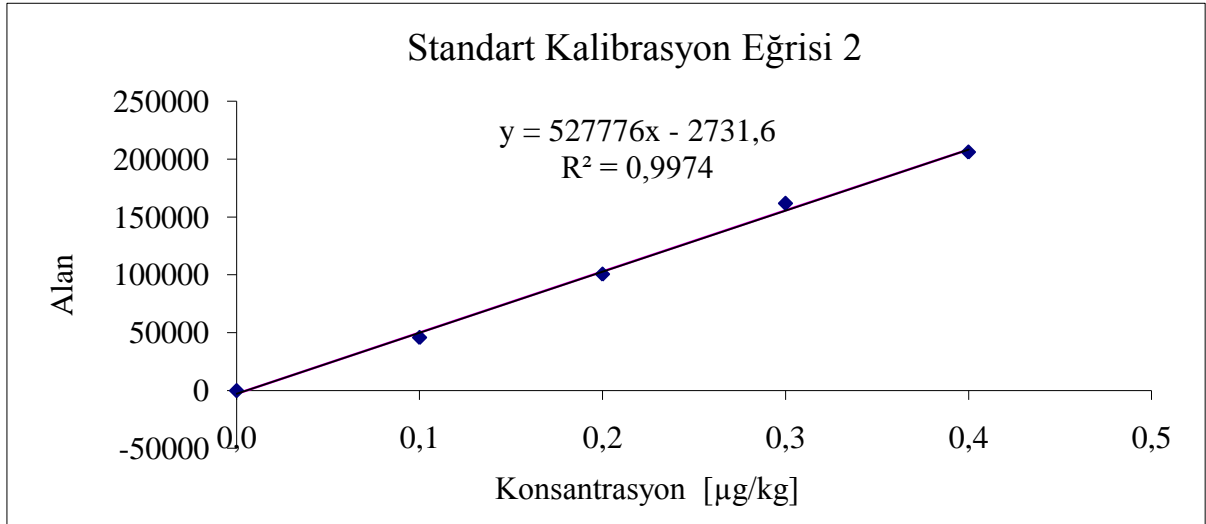
Zaman ve iyonlar arası oran kriterleri:

1.00 + 20% 0.44
1.00 - 20% 0.29

Cap [µg/kg]	Alan	Regresyon Analizi
0.0	0	-2732
0.1	45871	50046
0.2	100574	102824
0.3	161699	155601
0.4	205974	208379

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	527776	-2732
sd=	15591	3819
R ² =	0.9974	
R=	0.9987	



DATA	Madde	Iyon	RT [dak]	Oran RT	Alan	Cap [µg/kg]	Oran Ion2/Ion1	Rec.%
23_04_09								
cap03	Cap	321>152	0		0.0000E+00	0.0		
Tavuk eti	Cap	321>194	0		0.0000E+00			
	Cap_d5	326>157	8.09		2.0495E+05			
cap17	Cap	321>152	8.07	1.00	2.8021E+04	0.06		% 58
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	9.3636E+03		0.33	
	Cap_d5	326>157	8.07		2.3105E+05			
cap25	Cap	321>152	8.07	1.00	5.6825E+04	0.11		% 56
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	2.2823E+04		0.40	
	Cap_d5	326>157	8.07		1.0267E+05			
cap29	Cap	321>152	8.06	1.00	8.8531E+04	0.17		% 58
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	3.0773E+04		0.35	
	Cap_d5	326>157	8.06		1.1233E+05			
cap36	Cap	321>152	8.06	1.00	1.1043E+05	0.21		% 54
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	4.1740E+04		0.38	
	Cap_d5	326>157	8.06		1.3139E+05			

DATA	Madde	Iyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Oran RT	Alan	Cap [µg/kg]	Oran Ion2/Ion1	Rec.%
23_04_09								
cap04	Cap	321>152	0		0.0000E+00	0.00		
Tavuk eti	Cap	321>194	0		0.0000E+00			
	Cap_d5	326>157	8.09		2.5358E+05			
cap10	Cap	321>152	8.08	1.00	2.8084E+04	0.06		% 58
Tavuk eti	Cap	321>194	8.08	1.00	8.2431E+03		0.29	
	Cap_d5	326>157	8.08		2.2225E+05			
cap22	Cap	321>152	8.07	1.00	5.6919E+04	0.11		% 57
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	2.1821E+04		0.38	
	Cap_d5	326>157	8.07		1.6686E+05			
cap34	Cap	321>152	8.06	1.00	9.0787E+04	0.18		% 59
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	4.1719E+06		45.95	
	Cap_d5	326>157	8.06		1.8925E+05			
cap37	Cap	321>152	8.06	1.00	1.1748E+05	0.23		% 57
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	3.5302E+04		0.30	
	Cap_d5	326>157	8.06		1.3308E+05			

3. Gün

Standartlar ve kalibrasyon eğrisi

DATA	Madde	Iyon	Retensiyon Zamanı [dak]	Oran RT	Alan	Cap [µg/kg]	Oran Ion2/Ion1
24_04_09							
STD	Cap	321>152	0		0.0000E+00	0	
	Cap	321>194	0		0.0000E+00		
	Cap_d5	326>157	8.08		2.5222E+05		
STD	Cap	321>152	8.08	1.00	4.4686E+04	0.1	
	Cap	321>194	8.08	1.00	1.6754E+04		0.37
	Cap_d5	326>157	8.08		1.3104E+05		
STD	Cap	321>152	8.06	1.00	9.7043E+04	0.2	
	Cap	321>194	8.06	1.00	3.6883E+04		0.38
	Cap_d5	326>157	8.06		3.6200E+05		
STD 4	Cap	321>152	8.06	1.00	1.5070E+05	0.3	
	Cap	321>194	8.06	1.00	5.7262E+04		0.38
	Cap_d5	326>157	8.06		1.2047E+05		
STD 5	Cap	321>152	8.07	1.00	1.9855E+05	0.4	
	Cap	321>194	8.07	1.00	7.1539E+04		0.36
	Cap_d5	326>157	8.07		3.5415E+05		

0.38

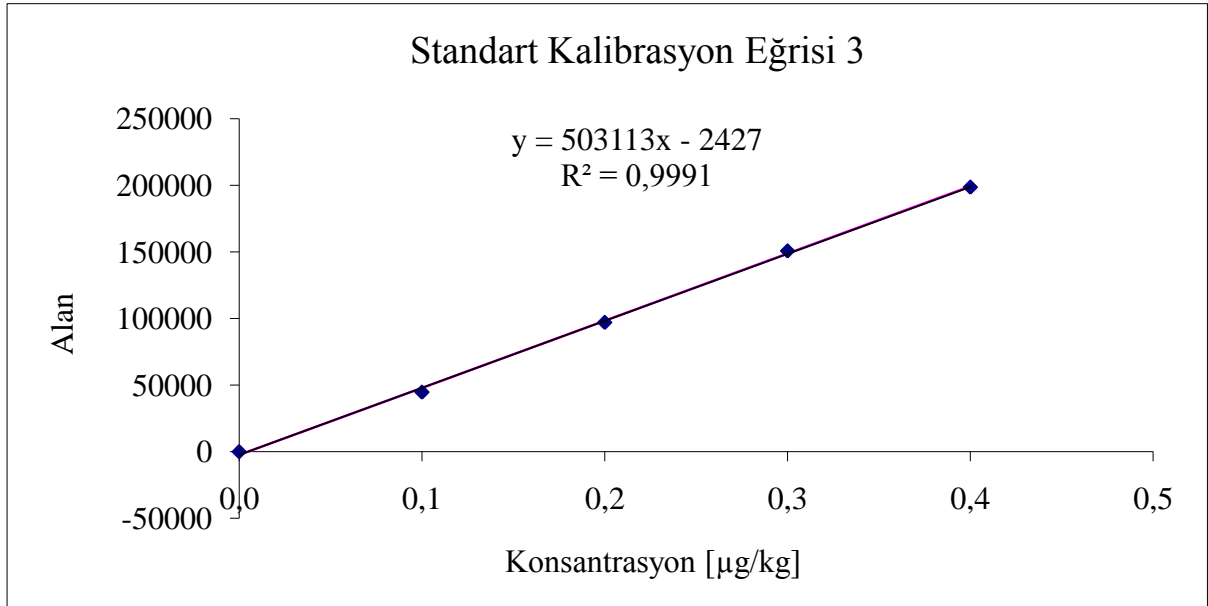
Zaman ve iyonlar arası oran kriterleri:

1.00 + 20% 0.45
1.00 - 20% 0.30

Cap [µg/kg]	Alan	Regresyon Analizi
0.0	0	-2561
0.1	44686	47884
0.2	97043	98330
0.3	150699	148775
0.4	198550	199221

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	503113	-2427
sd=	14881	2784
R ² =	0.9991	
R=	0.9995	



DATA	Madde	Iyon	RT [dak]	Oran RT	Alan	Cap [µg/kg]	Oran Ion2/Ion1	Rec.%
24_04_09								
cap07	Cap	321>152	0		0.0000E+00	0.0		
Tavuk eti	Cap	321>194	0		0.0000E+00			
	Cap_d5	326>157	8.09		2.8630E+05			
cap13	Cap	321>152	8.07	1.00	2.8912E+04	0.06		62%
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	9.9238E+03		0.34	
	Cap_d5	326>157	8.07		1.7179E+05			
cap18	Cap	321>152	8.07	1.00	5.7038E+04	0.12		59%
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	2.0586E+04		0.36	
	Cap_d5	326>157	8.07		2.1488E+05			
cap32	Cap	321>152	8.06	1.00	9.2952E+04	0.19		63%
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	3.5551E+04		0.38	
	Cap_d5	326>157	8.06		2.1229E+05			
cap38	Cap	321>152	8.05	1.00	1.2107E+05	0.25		61%
Tavuk eti	Cap	321>194	8.05	1.00	4.1250E+04		0.34	
	Cap_d5	326>157	8.05		1.3172E+05			

DATA 24_04_09	Madde	Iyon	RT [dak]	Oran RT	Alan	Cap [µg/kg]	Oran Ion2/Ion1	Rec.%
cap5	Cap	321>152	0		0.0000E+00	0.00		
Tavuk eti	Cap	321>194	0		0.0000E+00			
	Cap_d5	326>157	8.09		3.3558E+05			
cap16	Cap	321>152	8.07	1.00	3.0911E+04	0.07		% 66
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	9.5927E+03		0.31	
	Cap_d5	326>157	8.07		2.8582E+05			
cap20	Cap	321>152	8.07	1.00	5.7136E+04	0.12		% 59
Tavuk eti	Cap	321>194	8.07	1.00	2.0605E+04		0.36	
	Cap_d5	326>157	8.07		1.4595E+05			
cap33	Cap	321>152	8.06	1.00	9.6737E+04	0.20		% 66
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	3.6365E+04		0.38	
	Cap_d5	326>157	8.06		1.9951E+05			
cap39	Cap	321>152	8.06	1.00	1.2822E+05	0.26		% 65
Tavuk eti	Cap	321>194	8.06	1.00	5.1699E+04		0.40	
	Cap_d5	326>157	8.06		1.5163E+05			

Matriks Doğruluk Ölçüm Değerlerinin Özeti ve Ortalamaları (%Rec)

	Cap (µg/kg)			
	0.1	0.2	0.3	0.4
<i>Analiz 1</i>	% 56	% 52	% 54	% 49
<i>Analiz 2</i>	% 57	% 54	% 55	% 50
<i>Analiz 3</i>	% 58	% 56	% 58	% 54
<i>Analiz 4</i>	% 58	% 57	% 59	% 57
<i>Analiz 5</i>	% 62	% 59	% 63	% 61
<i>Analiz 6</i>	% 66	% 59	% 66	% 65
<i>Ortalama</i>	% 60	% 56	% 59	% 56

Matriks Kalibrasyon Eğrileri

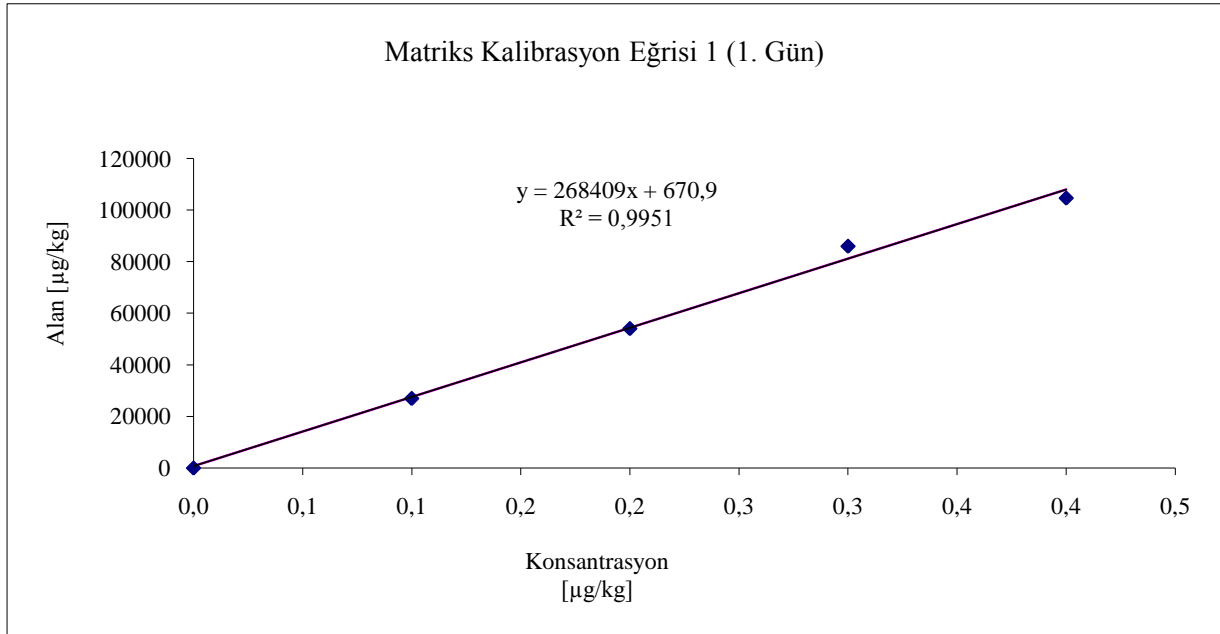
1. GÜN

Matriks kalibrasyon eğrisi (1. Gün - 1. Çalışma)

Cap [µg/kg]	Alan	Regresyon Analizi	Sonuç [µg/kg]	Delta
0.0	0	671	0	
0.1	26982	27512	0.10	% 98
0.2	54083	54353	0.20	% 99
0.3	86007	81194	0.32	% 106
0.4	104692	108034	0.39	% 97

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	268409	671
sd=	10823	2651
R ² =	0.9951	
R=	0.9976	

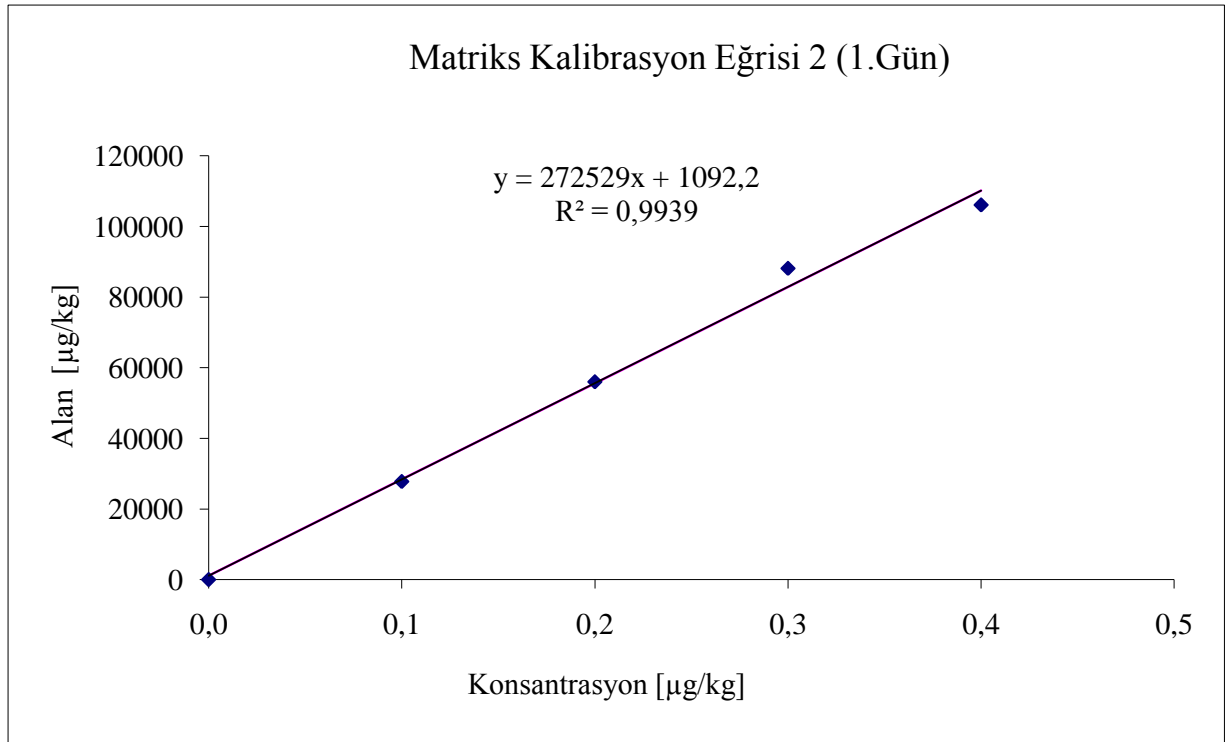


Matriks kalibrasyon eğrisi (1. Gün – 2. Çalışma)

Cap [µg/kg]	Alan	Regresyon Analizi	Sonuç [µg/kg]	Delta
0.0	0	1092	0	
0.1	27770	28345	0.10	% 98
0.2	56007	55598	0.20	% 101
0.3	88126	82851	0.32	% 106
0.4	106087	110104	0.39	% 96

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	272529	1092
sd=	12336	3022
R ² =	0.9939	
R=	0.9969	



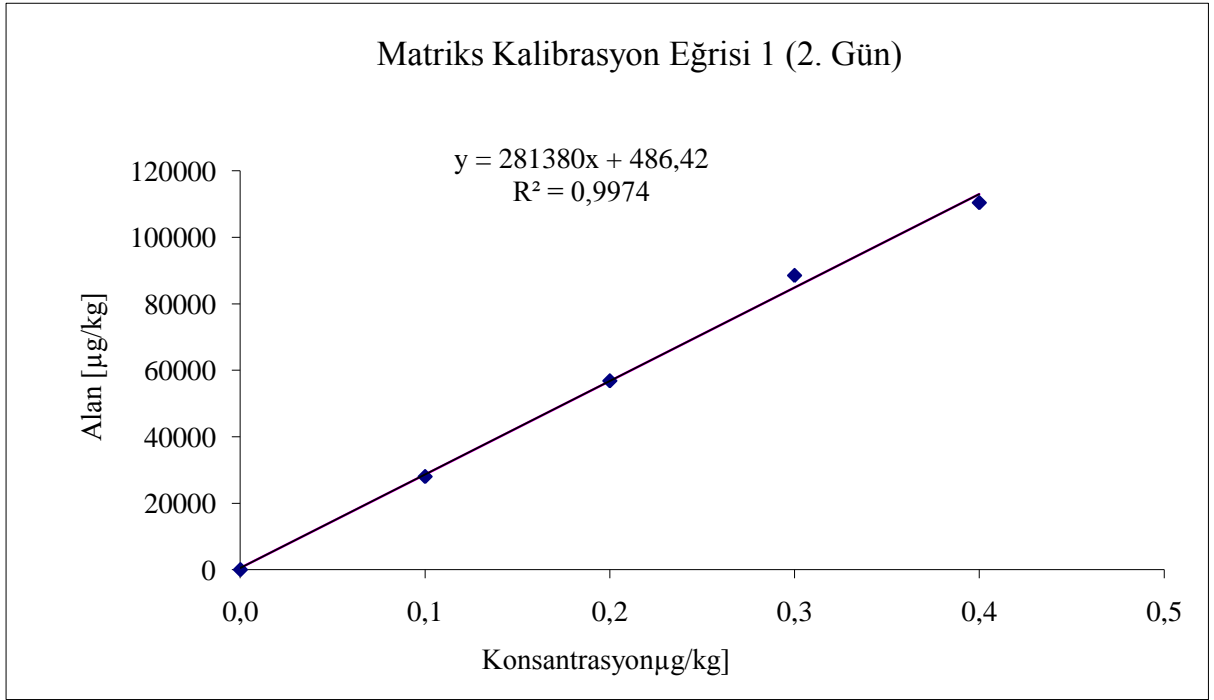
2. GÜN

Matrix kalibrasyon eğrisi (2. Gün – 1. Çalışma)

Cap [µg/kg]	Alan	Regresyon Analizi	Sonuç [µg/kg]	Delta
0.0	0	486	0.00	
0.1	28021	28624	0.10	% 98
0.2	56825	56762	0.20	% 100
0.3	88531	84900	0.31	% 104
0.4	110435	113038	0.39	% 98

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	281380	486
sd=	8280	2028
R ² =	0.9974	
R=	0.9987	

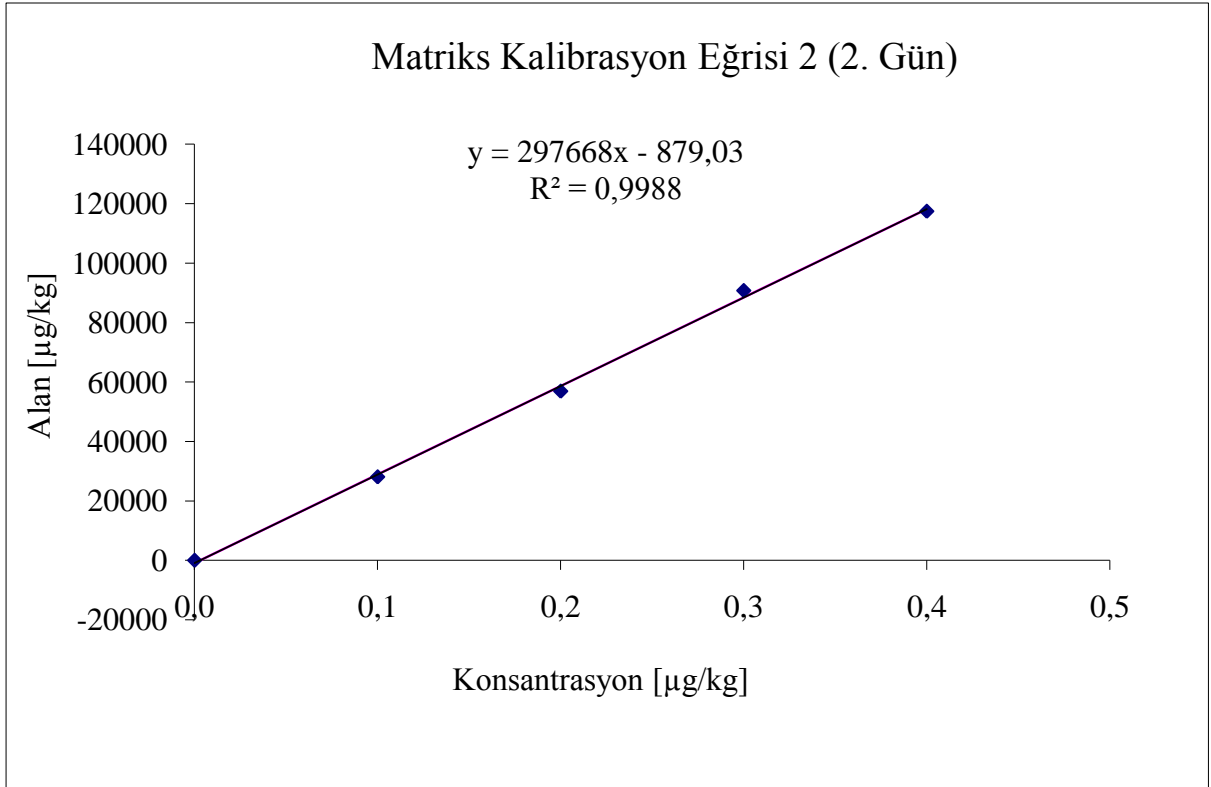


Matriks kalibrasyon eğrisi (2. Gün – 2. Çalışma)

Cap [µg/kg]	Alan	Regresyon Analizi	Sonuç [µg/kg]	Delta
0.0	0	-879	0.00	
0.1	28084	28888	0.10	% 97
0.2	56919	58655	0.19	% 97
0.3	90787	88421	0.31	% 103
0.4	117483	118188	0.40	% 99

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	297668	-879
sd=	5923	1451
R ² =	0.9988	
R=	0.9994	



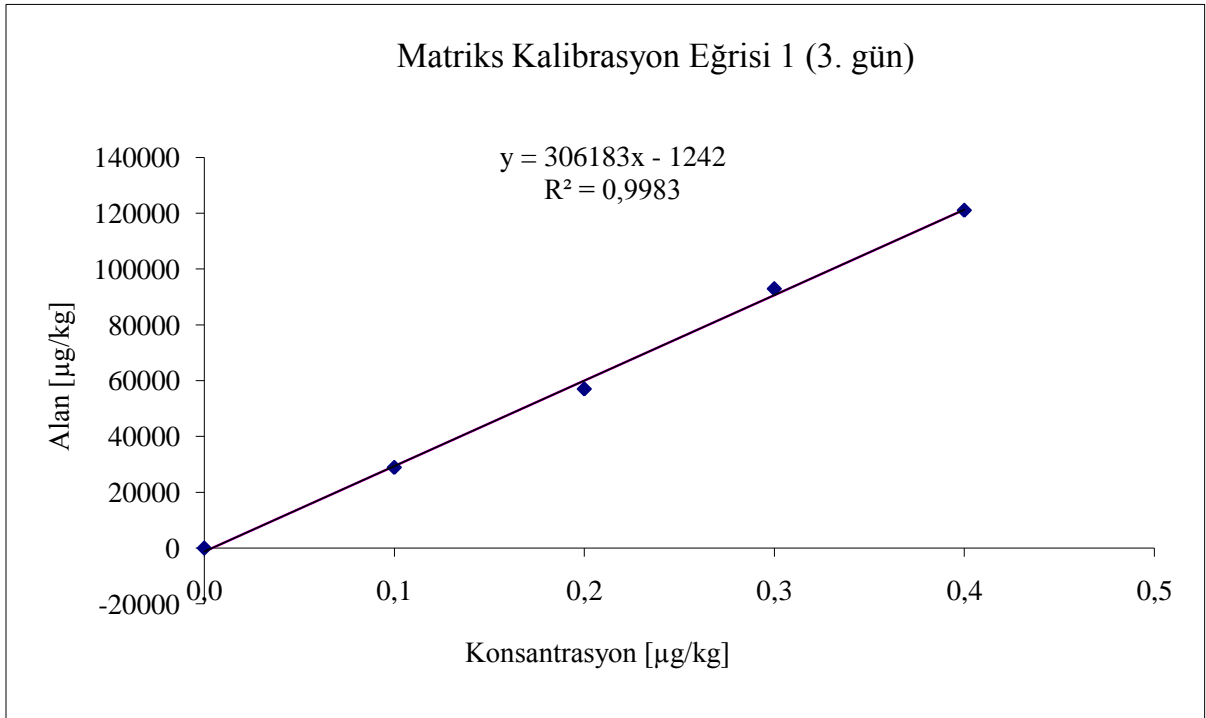
3. GÜN

Matriks kalibrasyon eğrisi (3. Gün – 1. Çalışma)

Cap [µg/kg]	Alan	Regresyon Analizi	Sonuç [µg/kg]	Delta
0.0	0	-1242	0.00	
0.1	28912	29376	0.10	% 98
0.2	57038	59995	0.19	% 95
0.3	92952	90613	0.31	% 103
0.4	121072	121231	0.40	% 100

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	306183	-1242
sd=	7302	1789
R ² =	0.9983	
R=	0.9991	

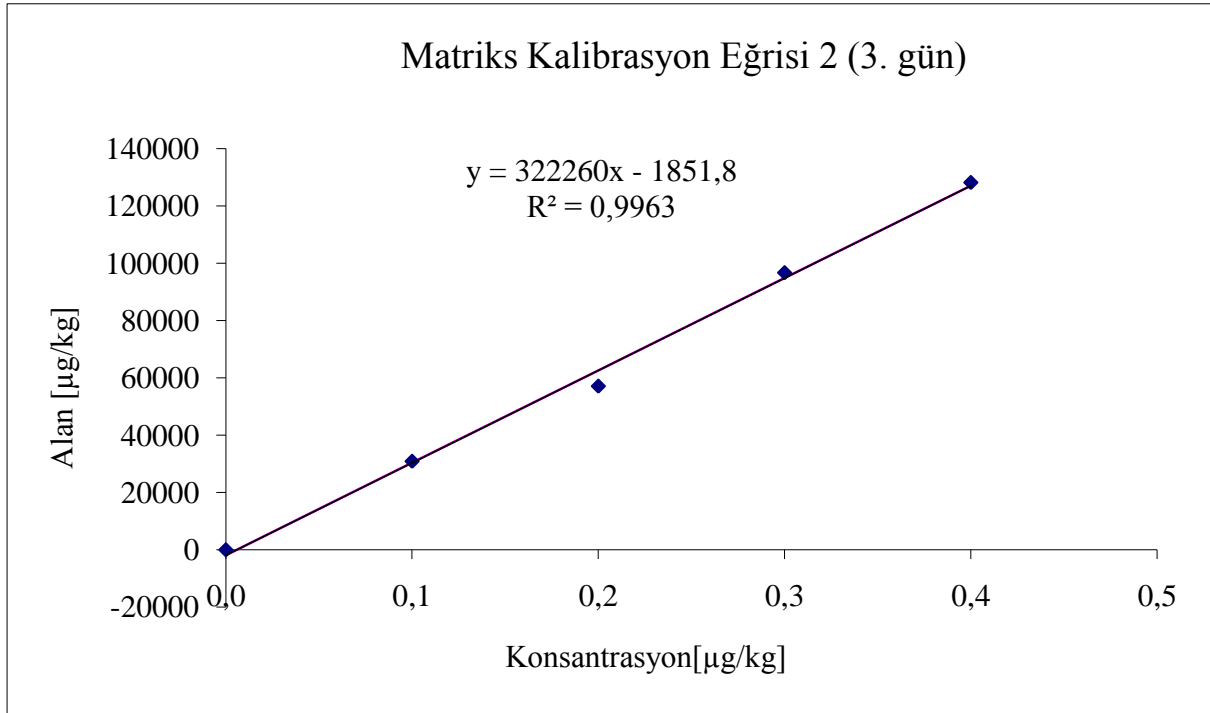


Matriks kalibrasyon eğrisi (3. Gün – 2. Çalışma)

Cap [µg/kg]	Alan	Regresyon Analizi	Sonuç [µg/kg]	Delta
0.0	0	-1852	0.01	
0.1	30911	30374	0.10	% 102
0.2	57136	62600	0.18	% 92
0.3	96737	94826	0.31	% 102
0.4	128217	127052	0.40	% 101

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	322260	-1852
sd=	11340	2778
R ² =	0.9963	
R=	0.9981	



Ortalama matriks kalibrasyon eğrisi

Cap [µg/kg]	Gün 1		Gün 2		Gün 3		Regresyon Analizi [µg/kg]	Std.Sapma [µg/kg]
	Matriks kal 1 [µg/kg]	Matriks kal 2 [µg/kg]	Matriks kal 1 [µg/kg]	Matriks kal 2 [µg/kg]	Matriks kal 1 [µg/kg]	Matriks kal 2 [µg/kg]		
0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.004
0.1	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.002
0.2	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.18	0.20	0.007
0.3	0.32	0.32	0.31	0.31	0.31	0.31	0.30	0.006
0.4	0.39	0.39	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40	0.007

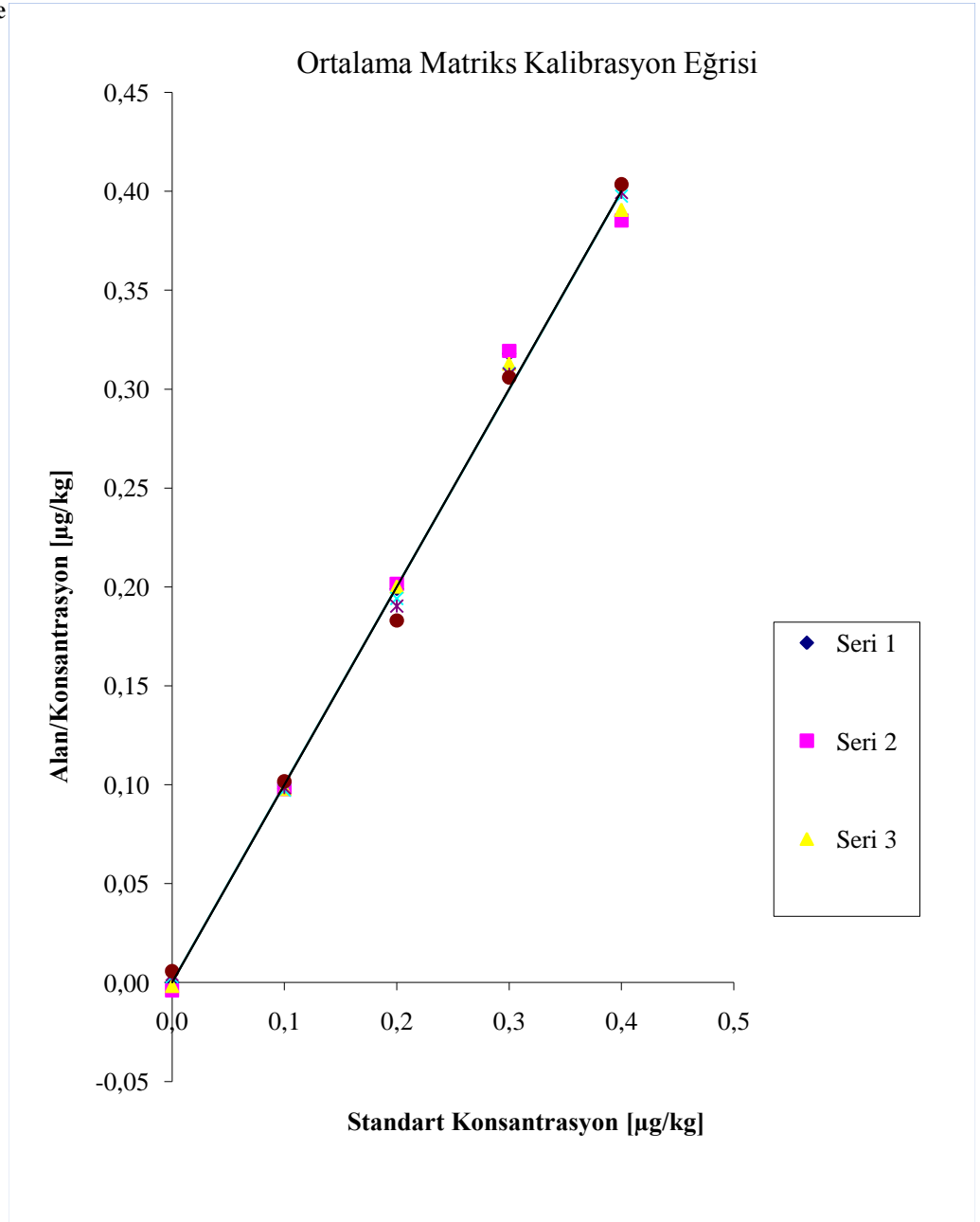
Cap[µg/kg]	CV [%]
0.1	% 2
0.2	% 4
0.3	% 2
0.4	% 2

Not: Üstteki tabloda sona gelen standart sapma * 6/(Gün1-Gün3 toplamı)

Regresyon Analizi: $y = mx + b$

	m	b
y=	0.9992	0.0002
sd=	0.0110	0.0027
R ² =	0.9966	
R=	0.9983	

Yükleme Cap [µg/kg]	Yükleme Sonuç [µg/kg]
0.0	0.00
0.0	0.00
0.0	0.00
0.0	0.00
0.0	0.00
0.0	0.00
0.0	0.01
0.1	0.10
0.1	0.10
0.1	0.10
0.1	0.10
0.1	0.10
0.1	0.10
0.2	0.20
0.2	0.20
0.2	0.20
0.2	0.19
0.2	0.19
0.2	0.18
0.3	0.32
0.3	0.32
0.3	0.31
0.3	0.31
0.3	0.31
0.3	0.31
0.4	0.39
0.4	0.39
0.4	0.39
0.4	0.40
0.4	0.40
0.4	0.40



Tayin Limiti CC α Belirlenmesi

1. Seçenek

X=0 için y eksenini üzerinde 0.0002 değerine standart sapmanın 2.33 katı eklenerek hesaplanır. Burada C0 değeri x= 0 olarak elde edilen y değeri üzerinden hesaplanmıştır. Yani kalibrasyon eğrisindeki y= ax+b (Blank' (kör)den gelen değerlerin standart sapması alınır)

Hesaplama

M=0 için Y değeri

0'ın standart sapması

$$0.0002 \quad + \quad 2.33 \quad * \quad 0.004 \quad = 0.009 \text{ (CC}\alpha\text{)}y$$

$$\text{CC}\alpha: (0.009 - 0.0002) / 0.9992 = 0.01 \text{ (CC}\alpha\text{)}x$$

2. Seçenek

Şayet elde edilen sonuç gerçekçi bulunmazsa aynı işlem X=0 'a karşılık Y değeri üzerinden alınır. Standart sapma olarak en düşük konsantrasyon seviyesindeki ölçümlerin standart sapması alınarak işlem yapılır.

y-ekseni üzerindeki 0.0002 değerine standart sapmanın 2.33 katı eklenerek hesaplanır. Burada C0 değeri x= 0 olarak elde edilen y değeri üzerinden hesaplanmıştır. Yani kalibrasyon eğrisindeki y= ax+b (1. konsantrasyon değerinden gelen değerlerin standart sapması alınır)

Hesaplama

M=0 için Y değeri

0.1'in standart sapması

$$0.0002 \quad + \quad 2.33 \quad * \quad 0.002 \quad = 0.004 \text{ (CC}\alpha\text{)}y$$

$$CC\alpha: (0.004 - 0.0002) / 0.9992 = 0.00 (CC\alpha)x$$

3. Seçenek

Bu değerde kullanılabilir bir sonuç vermediyse 1. konsantrasyonun ortalaması C0 değeri olarak alınır. İlk konsantrasyon seviyesindeki analizlerin sonuçlarını standart sapması alınarak hesaplama yapılır.

Y-ekseni 1. konsantrasyonun ortalama 0.1002 değerine standart sapmanın 2.33 katı eklenerek hesaplanır. Burada C0 değeri 1. seviyedeki konsantrasyonun ortalaması alınarak elde edilir. Kalibrasyon eğrisindeki $y = ax + b$ (1. konsantrasyon değerinden gelen değerlerin standart sapması alınır)

Hesaplama

0.1'in regaresyon analizi

0.1'in standart sapması

$$0.1002 + 2.33 * 0.002 = 0.104 (CC\alpha)y$$

$$CC\alpha: (0.104 - 0.0002) / 0.9992 = 0.10 (CC\alpha)x$$

Ölçüm Limiti $CC\beta$ Belirlenmesi

$$CC\beta = CC\alpha + 1.64 \text{ katı standart sapma kesim noktası}$$

* İlk yaklaşımda beklenen standard sapmanın en düşük noktada olmasıdır.

1. Seçenek

y-Ekseninde hesaplanan karar noktası: $0.01(CC\alpha)y$

$$(CC\beta)y = (CC\alpha)y + 1.64 \times SD_{wIR,CC\alpha}$$

$$(CC\beta)_y = 0.01$$

$$(CC\beta)_x = 0.01 \mu\text{g/kg}$$

2. Seçenek

y-ekseni üzerinde hesaplanan karar noktası: 0.00 (CC α)_y

$$(CC\beta)_y = (CC\alpha)_y + 1.64 \times SD_{wIR,CC\alpha}$$

$$(CC\beta)_y = 0.01$$

$$(CC\beta)_x = 0.01 \mu\text{g/kg}$$

3. Seçenek

y-ekseni üzerinde hesaplanan karar noktası 0.10 (CC α)_y

$$(CC\beta)_y = (CC\alpha)_y + 1.64 \times SD_{wIR,CC\alpha}$$

$$(CC\beta)_y = 0.11$$

$$(CC\beta)_x = 0.11 \mu\text{g/kg}$$

Metot Validasyon Parametreleri

Madde	İsim	İyon
	Cap	321>152
ISTD:	Cap	321>194
	Cap_d5	326>157

DATA	1.GÜN	22 04 09
	2.GÜN	23 04 09
	3.GÜN	24 04 09

Tayin karar limiti $CC\alpha$: 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Ölçüm limiti $CC\beta$: 0.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Geçerlilik : Elde bulunan sertifikalı referans metaryal (CRM)

Doğruluk (Geri Kazanım) : Standart Kalibrasyon

	Cap [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
	0.1	0.2	0.3	0.4
Analiz 1	% 56	% 52	% 54	% 49
Analiz 2	% 57	% 54	% 55	% 50
Analiz 3	% 58	% 56	% 58	% 54
Analiz 4	% 58	% 57	% 59	% 57
Analiz 5	% 62	% 59	% 63	% 61
Analiz 6	% 66	% 59	% 66	% 65
Ortalama	% 60	% 56	% 59	% 56

Matriks Kalibrasyon

	Cap [$\mu\text{g}/\text{kg}$]			
	0.1	0.2	0.3	0.4
Analiz 1	% 98	% 99	% 106	% 97
Analiz 2	% 98	% 101	% 106	% 96
Analiz 3	% 98	% 100	% 104	% 98
Analiz 4	% 97	% 97	% 103	% 99
Analiz 5	% 98	% 95	% 103	% 100
Analiz 6	% 102	% 92	% 102	% 101
Ortalama	% 98.5	% 97.3	% 104	% 98.5

Kesinlik

Laboratuvar içi tekrar edilebilirlik

2002/657/EC direktifine göre Nicel yöntemlerin kesinliği: Bir referans veya güçlendirilmiş materyalin tekrarlanmış analizi için sapma katsayısı (CV) üretilebilirlik koşulları altında, değişimin iç-laboratuvar katsayısı Horwitz denklemince hesaplanan düzeyi aşmamalıdır. 100 µg/kg için **üretkenlik CV' si (%) ≤ 23** olması gerekirken. 100 µg/kg'dan daha düşük konsantrasyonlar için CV' ler mümkün olduğu kadar düşük olmalıdır.

Tekrarlanabilirlik	
Cap	CV
[µg/kg]	[%]
0.1	% 2
0.2	% 4
0.3	% 2
0.4	% 2

Tekrar edilebilirlik koşulları altında yürütölen analizler için laboratuvarlar-arası CV genelde yukarıdaki değerlerin bir buçuk ve üçte ikisi arasında olur. Laboratuvar-içi üretilebilirlik koşulları altında yürütölen analizler için, laboratuvar-içi CV üretilebilirlik CV'sinden daha büyük olmayacaktır.

$$CV = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

Selektiviti : Bilinen hiçbir madde ile benzerlik gösteren iyon tespit edilmemiştir. Bazı numunelerde 257 iyonu geldiği görölmüştür.

Spesifikasyon : 20 adet boş blank (kör) çalışmasıyla elde edilmiştir (n > 20)

Sağlamlık : Youden-Plan araştırma aracılığıyla kolon sıcaklığı 30°C'den 40°C' ye çıkarıldığında performansta bir değişiklik olmadığı ancak RT'nin 8.34'ten 8.00'a geldiği göröldü. Mobil faz Asidiğe kaydığında RT 8.00'dan 7.80'e kaydığı göröldü. Performansta bir değişiklik olmadı.

Stabilite : Bu standartların zaman içerisinde ve farklı ısı derecelerinde kontrolü yapıldı.

Nitrofuran AOZ için Validasyon Sonuçları

Bu analiz metodu dört aşamada gerçekleştirildi;

1. Asidik ortamda serbest ve dokuya bağlı nitrofuran kalıntılarının 2-nitrobenzaldehit ile türevlendirilmesi,
2. Baz ilavesi ile türevlendirme reaksiyonunun durdurulması,
3. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile analitlerin kirliliklerden ayrıştırılması,
4. LC-MS/MS ile analizin yapılması.

Bu metodun validasyon çalışması, aşağıdaki parametreler göz önüne alınarak yapılmıştır.

I. Lineer Ölçüm Aralığı

II. Tayin Limiti

III. Ölçüm Limiti

IV. Kesinlik

- Tekrar edilebilirlik
- Tekrar üretilebilirlik

V. Geri kazanım

VI. CC α , CC β

VII. Spesifiklik/Seçicilik

I. Linear ölçüm aralığı

Linear ölçüm aralığını belirlemek için 4 farklı konsantrasyonda 6'şar tekrarlı standart hazırlanarak enjeksiyon yapıldı.

0,5	µg/kg	1	µg/kg	1,5	µg/kg	2	µg/kg
	Sonuç		Sonuç		Sonuç		Sonuç
Tekrar 1	0.107	Tekrar 1	0.241	Tekrar 1	0.362	Tekrar 1	0.490
Tekrar 2	0.108	Tekrar 2	0.253	Tekrar 2	0.371	Tekrar 2	0.494
Tekrar 3	0.108	Tekrar 3	0.232	Tekrar 3	0.363	Tekrar 3	0.492
Tekrar 4	0.110	Tekrar 4	0.233	Tekrar 4	0.350	Tekrar 4	0.472
Tekrar 5	0.107	Tekrar 5	0.230	Tekrar 5	0.354	Tekrar 5	0.504
Tekrar 6	0.114	Tekrar 6	0.232	Tekrar 6	0.359	Tekrar 6	0.488
Ortalama	0.109		0.237		0.360		0.490

II –III. Tayin limiti ve ölçüm limiti

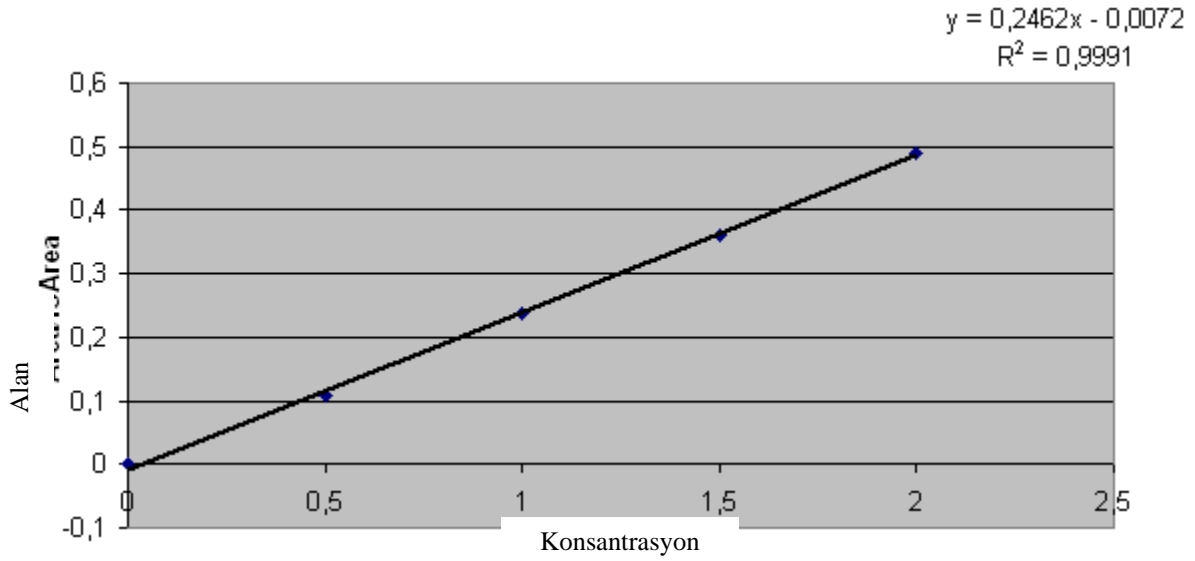
Lineer ölçüm aralığında oluşturulan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Tayin Limiti} = 3.3 \cdot \text{SD}/m$$

$$\text{Ölçüm Limiti} = 10 \cdot \text{SD}/m$$

SD = Kalibrasyon eğrisinde 0.5 µg/kg seviyesindeki standart hata

m= Kalibrasyon eğrisinin eğimi



$$\text{LOD} = 3.3 \cdot \text{SD}/m \quad \mathbf{0.038} \quad \mu\text{g/kg}$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \text{SD}/m \quad \mathbf{0.117} \quad \mu\text{g/kg}$$

$$\text{U(Co) (Denklem Belirsizliği)} = \mathbf{0.0316}$$

IV. Kesinlik

a. Tekrar edilebilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışması üç farklı seviyede spike edilmiş örnekle, her seviye için 6 tekrar yapılarak 3 farklı günde gerçekleştirilmiştir.

1 kat MRPL		1		µg/kg		1.5 kat MRPL		1,5		µg/kg		2 kat MRPL		2		µg/kg			
	Gün	Gün	Gün		Gün	Gün	Gün		Gün	Gün	Gün		Gün	Gün	Gün		Gün	Gün	Gün
	1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
Tekrar 1	1.009	1.021	1.006	Tekrar 1	1.602	1.492	1.47	Tekrar 1	1.929	1.998	2.018								
Tekrar 2	0.998	1.068	0.986	Tekrar 2	1.594	1.527	1.581	Tekrar 2	1.965	2.014	2.062								
Tekrar 3	1.049	0.983	1.01	Tekrar 3	1.525	1.497	1.446	Tekrar 3	1.97	2.012	2.07								
Tekrar 4	1.05	0.986	1.029	Tekrar 4	1.605	1.446	1.551	Tekrar 4	1.911	1.928	2.063								
Tekrar 5	1.027	0.976	0.98	Tekrar 5	1.47	1.464	1.512	Tekrar 5	2.039	2.055	2.026								
Tekrar 6	1.042	0.982	1.024	Tekrar 6	1.613	1.482	1.583	Tekrar 6	1.95	1.993	1.99								
Ortalama	1.03	1.00	1.01	Ortalama	1.57	1.48	1.52	Ortalama	1.96	2.00	2.04								
S.D.	0.02	0.04	0.02	S.D.	0.06	0.03	0.06	S.D.	0.04	0.04	0.03								
C.V.	2.12	3.57	1.96	C.V.	3.68	1.89	3.78	C.V.	2.26	2.07	1.56								
Genel Ortalama			1.01	Genel Ortalama			1.53	Genel Ortalama			2.00								
Genel SD			0.03	Genel SD			0.06	Genel SD			0.05								
Genel CV			2.8	Genel CV			3.8	Genel CV			2.5								

b. Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik çalışması 1 µg/kg seviyesinde spike edilmiş örnekle 5 paralel olacak şekilde, 2 ayrı kişi tarafından 4 ayrı günde gerçekleştirilen 5 farklı çalışmadan oluşturulmuştur.

MRPL 1 µg/kg

1 kat MRPL	1 µg/kg				
	Kişi 1	Kişi 2	Kişi 1	Kişi 2	Kişi 1
Tekrar 1	0.986	1.028	1.03	0.998	1.068
Tekrar 2	1.01	1.01	1.034	1.049	0.983
Tekrar 3	1.029	0.937	0.947	1.05	0.986
Tekrar 4	0.98	1.022	1.018	1.042	0.976
Tekrar 5	1.024	1.015	0.997	1.027	0.982
Ortalama	1.01	1.00	1.01	1.03	1.00
S.D.	0.02	0.04	0.04	0.02	0.04
C.V.	2.19	3.71	3.54	2.10	3.88
Genel Üretilebilirlik Ortalaması					1.01
Genel Üretilebilirlik SD					0.03
Genel Üretilebilirlik CV					3.1

V. Geri kazanım (%)

Geri kazanım çalışması üç farklı seviyede spike edilmiş örnekle, her seviye için 6 tekrar yapılarak 3 farklı günde gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım her seviye için hazırlanan matriks standart kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır.

1 kat MRPL		1 µg/kg		1.5 kat MRPL		1,5 µg/kg		2 kat MRPL		2 µg/kg	
	Gün 1	Gün 2	Gün 3		Gün 1	Gün 2	Gün 3		Gün 1	Gün 2	Gün 3
Tekrar 1	0.886	0.91	0.853	Tekrar 1	1.41	1.383	1.164	Tekrar 1	1.698	1.892	1.53
Tekrar 2	0.876	0.957	0.839	Tekrar 2	1.402	1.418	1.238	Tekrar 2	1.73	1.907	1.56
Tekrar 3	0.921	0.873	0.855	Tekrar 3	1.341	1.388	1.147	Tekrar 3	1.734	1.905	1.565
Tekrar 4	0.922	0.875	0.868	Tekrar 4	1.412	1.337	1.217	Tekrar 4	1.682	1.821	1.56
Tekrar 5	0.902	0.865	0.835	Tekrar 5	1.293	1.355	1.192	Tekrar 5	1.796	1.948	1.536
Tekrar 6	0.915	0.871	0.864	Tekrar 6	1.419	1.374	1.239	Tekrar 6	1.716	1.886	1.511
Ortalama	0.90	0.89	0.85	Ortalama	1.38	1.38	1.20	Ortalama	1.73	1.89	1.54
S.D.	0.02	0.04	0.01	S.D.	0.05	0.03	0.04	S.D.	0.04	0.04	0.02
C.V.	2.13	4.00	1.55	C.V.	3.70	2.04	3.21	C.V.	2.29	2.19	1.39
% Geri Kazanım	90.4	89.2	85.2	% Geri Kazanım	92.0	91.7	80.0	% Geri Kazanım	86.3	94.7	77.2
Genel Ortalama	0.88			Genel Ortalama	1.32			Genel Ortalama	1.72		
Genel SD	0.03			Genel SD	0.09			Genel SD	0.15		
Genel CV	3.7			Genel CV	7.2			Genel CV	8.7		
Genel %Geri Kazanım	88.3			Genel % Geri Kazanım	87.9			Genel % Geri Kazanım	86.0		

VI. CC_{α} , CC_{β}

Bu amaçla 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ seviyesinde farklı günlerde spike yapılmış 25 ayrı çalışma gerçekleştirilmiştir.

$$CC_{\alpha} = c1 + 2.33 * SD_{\text{wif}}$$

$$CC_{\beta} = CC_{\alpha} + 1.64 * SD_{\text{wif,cca}}$$

MRPL **1** **$\mu\text{g}/\text{kg}$**

1 kat MRPL		1		$\mu\text{g}/\text{kg}$	
	Sonuçlar			Sonuçlar	
Tekrar 1	0.998	Tekrar 14		0.98	
Tekrar 2	1.049	Tekrar 15		1.024	
Tekrar 3	1.05	Tekrar 16		1.028	
Tekrar 4	1.042	Tekrar 17		1.01	
Tekrar 5	1.027	Tekrar 18		0.937	
Tekrar 6	1.068	Tekrar 19		1.022	
Tekrar 7	0.983	Tekrar 20		1.015	
Tekrar 8	0.986	Tekrar 21		1.03	
Tekrar 9	0.976	Tekrar 22		1.034	
Tekrar 10	0.982	Tekrar 23		0.947	
Tekrar 11	0.986	Tekrar 24		1.018	
Tekrar 12	1.01	Tekrar 25		0.997	
Tekrar 13	1.029				
Ortalama				1.01	
S.D.				0.03	
C.V.				3.15	

$$CC_{\alpha} = 1.07$$

$$CC_{\beta} = 1.13$$

VII. Spesifiklik/Seçicilik

Spesifiklik için nitrofüran grubu antibiyotik bileşiği içermediği bilinen 20 farklı örnek analiz edilerek piklerin çıkış zamanlarında herhangi bir interfere yapıp yapmadığına bakıldı. Sonuçta herhangi bir interferasyon gözlenmedi. Bu numuneler validasyon çalışmalarında kullanıldı ve tamamına yükleme yapılarak nitrofüran bileşiklerinin tanımlandığı görüldü.

Genel Validasyon Sonuçları

LOD	0.038 µg/kg	AOZ Konsan.	Geri Kazanım	CV
LOQ	0.117 µg/kg	[µg/kg]	[%]	[%]
CC_α	1.07	1	88.3	2.8
CC_β	1.13	1.5	87.9	3.8
Linearite Aralığı	0.5-2 µg/kg	2	86.0	2.5

KAYNAKLAR

- 1- TÜRKER S. Hayvansal Gıdalarda Kalite Kontrolü. Tamer Matbaacılık, Ankara, 1997.
- 2- UĞUR M, NAZLI B, BOSTAN K. Gıda Hijyeni. Teknik Yayınları, İstanbul, 1999.
- 3- SOYUTEMİZ E. Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Bursa, 2005.
- 4- EROL İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Özel Basım, Ankara, 2007
- 5- ANONİM: T.C. BAŞBAKANLIK TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU. Hayvansal Üretim 2009 Haber Bülteni, sayı:87, 2010.
- 6- PAVLOV A, LASHEV L, VACHIN I, RUSEV V. Residues of antimicrobial drugs in chicken meat and offals. *Trakia Journal of Sciences*, Vol 6, Suppl. 1: 23-25, 2008.
- 7- BLASCO C, TORRES C, PICO Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 9: 895-913, 2007.
- 8- KABIR J, UMOH V, AUDU-OKOH E, UMOH J, KWAGA J. Veterinary drug use in poultry farms and determination of antimicrobial drug residues in commercial eggs and slaughtered chicken in Kaduna State, Nigeria. *Food Control*, 15: 99-105, 2004.
- 9- BIRD HR. Biological basis for the use of antibiotics in poultry feeds. In: the use of drugs in animal feeds. Publication No. 1679, National Academy of Sciences, Washington, DC., 1969.
- 10- BRAUDE R. Antibiotics in animal feeds in Great Britain. *Journal of Animal Science*, 46: 1425–1436, 1978.
- 11- DAFWANG II, COOK ME, SUNDE ML. Interaction of dietary antibiotic supplementation and stocking density on broiler chick performance and immune response. *British Poultry Science*, 28: 47–55, 1987.
- 12- CHOI JH, RYU KS. Responses of broilers to dietary zinc bacitracin at two different planes of nutrition. *British Poultry Science*, 28: 113–118, 1987.
- 13- CRAVENS WW, HOLCK GL. Economic benefits to the use of livestock producer and consumer from the use of feed additives. *Journal of Animal Science*, 31: 1102–1106, 1970.
- 14- EYSEN H, SOMER P. Effect of antibiotics on growth and nutrient absorption of chicks. *Poultry Science*, 42: 1373–1379, 1963.
- 15- SALEHZADEH F, MADANI R, SALEHZADEH A, ROKNI N, GOLCHINEFAR F. Oxytetracycline residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5 (4): 377-381, 2006.
- 16- VAN DEN BOGAARD A, STOBBERINGH E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14: 327–335, 2000.
- 17- TOLLEFSON L, KARP BE. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 34: 514-521, 2004.
- 18- TOLDRA F, REIG M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 482-489, 2006.
- 19- STOLKER AAM, ZUIDEMA T, NIELEN M. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 10: 967-979, 2007.
- 20- KUMMERRER K. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotography*, 52: 5-7, 2003.
- 21- KOOLS SAE, MOLTMANN JF, KNACKER T. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50: 59–65, 2008.

- 22-** ANONİM: IX. KALKINMA PLANI İLAÇ SANAYİİ ÖZEL İHTİSAS KOMİSYONU. Veteriner ilaç sanayi alt çalışma grubu (VİSAD) raporu, 2006.
- 23-** EROL İ, ORMANCI FS, AYAZ D. Hindi etlerinden izole edilen *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium perfringens* izolatlarının antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi. 2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi Bildiri Kitabı. Acar Basım, İstanbul, sayfa: 116-123, 2006.
- 24-** CENGİZ M. Çevrede veteriner antibakteriyel ilaçlarının (tetrasiklin ve sulfonamidler) araştırılması. Doktora Tezi, U.Ü. Sağ. Bil. Ens. Vet. Fak. Far. Tok. ABD., Bursa, 2007.
- 25-** HAALING SORENSEN B, NORS-NIELSEN S, LANZKY PF, INGERSLEV F, HOLTEN LUTZHOFT HC, JORGENSEN SE. Occurance, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- a review. *Chemosphere*, 36: 357-393, 1998.
- 26-** GÜDER G. Avrupa Birliği gıda güvenliği politikası ve üyelik sürecinde Türkiye'ye yansımaları. Uzmanlık Tezi, yayın no: 2696, Ankara, 2006.
- 27-** KIRDAR SS, KURŞUN O. Türkiye'de gıda güvenliğinde karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri. 3. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi Kitabı, Bursa, sayfa: 393, Poster, 2009.
- 28-** GÜRBÜZ Ü, GÖKMEN M, TORLAK E. Gıda güvenliği. 2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi Bildiri Kitabı. Acar Basım, İstanbul, sayfa: 58-67, 2006.
- 29-** HOOGENBOOM LAP, BRUCHEM GDV, SONNE K, ILONA C, ENNINGA C, JOHANNES A. VAN RHIJN A, HENRI HESKAMP A, MARGOT BM, HUVENEERS-OORSRONG, JAN CM, VAN DER HOEVEN C, HARRY A, KUIPER A. Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11: 273-287, 2002.
- 30-** KAYA S, PİRİNÇCİ İ, ÜNSAL A, KARAER Z, TARŞ B, BİLGİLİ A, AKAR F. Veteriner Farmakoloji, cilt:2; baskı: 4. Medisan Yayınevi, sayfa:737-768, Ankara, 2007.
- 31-** ANONİM; DPT 9. Kalkınma Planı Özel İhtisas Komisyonu Raporu. 148s, 2007.
- 32-** REIG M, TOLDRA F. Veterinary drug residues in meat: concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*, 78: 60-67, 2008.
- 33-** TAYAR M. Gıda Kimyası. Uludağ Üniversitesi Karacabey Meslek Yüksekokulu. Bursa, sayfa: 1-72, 1999.
- 34-** DURU M, ŞAHİN A. Türkiye'de sağlıklı ve güvenli hayvansal üretimin gerekliliği. *Hayvansal Üretim*, 45 (1): 36-41, 2004.
- 35-** TÜRK E, LİMAN BC. Kayseri'de sığır idrarlarında ve yemlerde zeranoI'un ELISA ve ince tabaka kromatografi ile kantitatif analizi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(1): 21-25, 2004.
- 36-** NORMAN N, POTTER. *Food Science*. Third edition. Avi publishing, Westport, sayfa: 422-456, 1984.
- 37-** NAZLI B, ÇOLAK H, HAMPİKYAN H. İstanbul piyasasında satışı sunulan sakatatlarda bazı anabolizan kalıntılarının mevcudiyeti üzerine bir çalışma. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 31 (1): 83-89, 2005.
- 38-** BROWN M. *Haccp in the Meat Industry*. Woodhead publishing limited, Cambridge, sayfa: 38-43.; 123-125, 2000.
- 39-** CANOLER Y. BESD-BİR, 2007 yılı kanatlı sektörü özet raporu, Ankara, 2008.
- 40-** ANONYMUS: FAO, FAO statistic division 2010, 05 February 2010.
- 41-** ŞANLI Y. Hayvansal üretimde yem ve ilaç kullanımından kaynaklanan olumsuz etmenleri. Editör: BÜLBÜL H. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Konya il kontrol laboratuvar müdürlüğü. Yemlerde kalite kontrolü ve olumsuzlukları, Konya, sayfa: 83-148, 2007.

- 42-** FİLAZİ A. Kanatlılarda akılcı antibakteriyel ilaç kullanımı. Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara, 7 (2): 3-8, 2009.
- 43-** CORCIA AD, NAZZARI M. Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography A*, 974: 53–89, 2002.
- 44-** DONOGHUE DJ. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? *Poultry Science*, 82: 618–621, 2003.
- 45-** DEMİR C. Hayvansal gıdalardaki antibiyotik ve hormon kalıntılarının insan sağlığı üzerine olası etkileri ve yasal düzenlemeler. *Dünya GIDA Dergisi*, sayı: 5, sayfa: 52, 2004.
- 46-** KENNEDY DG, MCCRACKEN RJ, CANNAVAN A, HEWITT SA. Use of liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *Journal of Chromatography A*, 812: 77-98, 1998.
- 47-** CAN HY, ÇELİK TH. Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ve kalıntı riski. *Veteriner Hekim Derneği Dergisi*, 79 (4): 35-40, 2008.
- 48-** SALEHZADEH F, SALEHZADEH A, ROKNI N, MADANI R, GOLCHINEFAR F. Enrofloxacin residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6 (4): 409-413, 2007.
- 49-** MILLER DJS. Present state and trends in the use of veterinary drugs. Editors: HAAGSMA N, RUITER A, EYSENBERG PBC. *Euro Residue II, Conference on residues of veterinary drugs in food*, Veldhoven, The Netherlands, page: 65-74, 1993.
- 50-** ORUÇ HH, CENGİZ M, BAĞDAŞ D, UZUNOĞLU İ. Sığır etlerinde streptomisin ve sulfametazin (sulfadimidin) kalıntıları. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26 (1-2): 17-20, 2006.
- 51-** TAYAR M. Gıda Güvenliği. Editör: YILMAZ M. Ekosan Matbaacılık, İstanbul, 2010.
- 52-** TEH WL, RIGG AS. Possible penicillin allergy after eating chicken. *Lancet* ii, 1632, 1992.
- 53-** IMPENS S, REYBROECK W, VERCAMMEN J, COURTHEYN D, OOGHE S, WASCH K, SMEDTS W, BRABANDER H. Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC–MS2 and LC–MS2. *Analytica Chimica Acta*, 483: 153–163, 2003.
- 54-** PULLEN M. Residues. *Meat and Health*. Edited by; PEARSON AM, DUTSON TR. *Advances in meat research*, Volume 6, Elsevier Applied Science, USA., sayfa: 135-156, 1990.
- 55-** VAN DRESSER WR, WILCKE JR. Drug residues in food animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 194: 1701–1710, 1989.
- 56-** BANE DP, KNIFFEN TS, HALL WF. Sulfamethazine residues in swine: Comparison of on farm monitoring methods. *Preventive Medicine*, 7: 303–309, 1989.
- 57-** TAJICK M, SHOHREH B. Detection of antibiotics residue in chicken meat using TLC. *International Journal of Poultry Science*, 5 (7): 611-612, 2006.
- 58-** OGGARD H. Incidence of drug resistance and transmissible R factor in strains of *E.coli* isolated from faeces of healthy pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 14: 381-391, 1973.
- 59-** LINTON AH. Antibiotics, animals and man, an appraisal of a contentious subject. In *antibiotics and antibiotic resistance in agriculture*, 1st ed. Butterworth Inc: London, page: 315-343, 1977.
- 60-** BAGUERO F, MARTINEZ JL, CANTON R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 260-265, 2008.

- 61-** ERGİNKAYA Z, YURDAKUL NE. Gıdalardaki *Enterococcus faecium*'un antibiyotik direnci. 2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi Bildiri Kitabı. Acar Basım, İstanbul, sayfa: 94-107, 2006.
- 62-** COCCONCELL P, CATTIVELLI D, GAZZOLA S. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistance among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 315-323, 2003.
- 63-** GIRAFFA G. Enterococci from food. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 163-171, 2002.
- 64-** QUEDNAU M, AHRNE S, MOLIN G. Genomic relationships between *Enterococcus faecium* strains from different sources with different antibiotic resistance profiles evaluated by restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA using EcorI and PvuII. *Applied and Environmental Microbiology* Apr., 1777-1780, 1999.
- 65-** LU H, WENG X, LI H, YIN Y, PANG M, TANG Y. *Enterococcus faecium*-related outbreak with molecular evidence transmission from pigs to humans. *Journal of Clinical Microbiology*, vol; 40, 3: 913-917, 2002.
- 66-** HAMMES W, HERTEL C. Research approaches for pre-and probiotics: challenges and outlook food research. *International Journal of Food Microbiology*, 35: 165-170, 2001.
- 67-** EATON T, GASSON M. A variant Enterococcal surface protein Esp_{fm} in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical and environmental isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 216: 269-275, 2002.
- 68-** LUND B, ADAMSSON I, EDLUND C. Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *International Journal of Food Microbiology*, 77: 109-115, 2002.
- 69-** BORGES K, SØRUM M, WASTESON Y, KRUSE H. VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 89-94, 2001.
- 70-** OKEKE IN, LAXMINARAYAN R, BHUTTA ZA, DUSE AG, JENKINS P, O'BRIEN TF, MENDEZ AP, KLUGMAN KP. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *The Lancet Infectious Diseases*, vol: 5 August, 2005.
- 71-** MACBEAN LD. A perspective on food safety concerns. *Dairy and Food Sanitation* 8: 112, 1988.
- 72-** RESURRECCION AVA, GALVEZ FCF. Will consumers buy irradiated beef? *Food Technology*, 53: 52-55, 1999.
- 73-** ANONİM: GIDA GÜVENLİĞİ DERNEĞİ. Türkiye gıda güvenliği bilgi düzeyi araştırması raporu, İstanbul, ağustos 2008.
- 74-** JAFARI MT, KHAYAMIAN T, SHAER V, ZAREI N. Determination of veterinary drug residues in chicken meat using corona discharge ion mobility spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 581: 147-153, 2007.
- 75-** AL-GHAMDI MS, AL-MUSTAFA ZH, EL-MORSY F, AL-FAKY A, HAIDER I, ESSA H. Residues of tetracycline compounds in poultry products in the eastern province of Saudi Arabia. *Public Health*, 114: 300-304, 2000.
- 76-** GUEST GB, PAIGE JC. The magnitude of the tissue residue problem with regard to consumer needs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198: 805-809, 1991.
- 77-** HUBER WG, CARLSON MB, LEPPER MH. Penicillin and antimicrobial drug residues in domestic animals at slaughter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 154: 1590-1595, 1969.

- 78-** OBOEGBULEM SI, FIDELIS AP. Detection of antimicrobial residues in poultry meat and slaughter cattle in Nigeria. *Meat Science*, 43, 71–74, 1996.
- 79-** ŞANLI Y. Veteriner Klinik Farmakoloji ve İlaçla Sağaltım İlkeleri. Genişletilmiş 3. Baskı. Özkan Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara 1999.
- 80-** HEN H, JIANG H. Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC–UVD, GC–ECD, GC–MS–EI–SIM and GCMS–NCI–SIM methods. *Analytica Chimica Acta*, 535: 33–41, 2005.
- 81-** FERGUSON J, BAXTER A, YOUNG P, KENNEDY G, ELLIOTT C, WEIGEL S, GATERMANN R, ASHWIN H, STEAD S, SHARMAN M. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol. *Analytica Chimica Acta*, 529: 109–113, 2005.
- 82-** AKAR F, YAVUZ H, LİMAN BC, DOĞAN A, FİLAZİ A. Tavşan dokularında kloramfenikol kalıntıları üzerine bir çalışma. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 37 (2): 313-322, 1990.
- 83-** SCORTICHINI G, ANNUNZIATA L, HAOUET MN, BENEDETTI F, KRUSTEVA I, GALARINI R. ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. *Analytica Chimica Acta*, 535: 43–48, 2005.
- 84-** SANTOS L, BARBOSA J, CASTILHO MC, RAMOS F, RIBEIRO CAF, SILVEIRA MIND. Determination of chloramphenicol residues in rainbow trouts by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 529: 249–256, 2005.
- 85-** BARADAT M, ALARY J, CRAVEDI. Residues of chloramphenicol in rainbow trout. Editors: HAAGSMA N, RUITER A, EYSENBERG PBC. *Euro Residue II, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands*, page: 160-164, 1993.
- 86-** REBECCA S, NICOLICH A, EDUARDO, WERNECK-BARROSO B, MARLICE A. S’IPOLI MARQUES A. Food safety evaluation: detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 565, 97–102, 2006.
- 87-** COSTA MH, SOARES ME, FERNANDES JO, BASTOS ML, FERREIRA M. Evaluation of residues of chloramphenicol in liver, kidney, muscle and blood of rabbits and stability studies during storage and after a cooking procedure. Editors: HAAGSMA N, RUITER A, EYSENBERG PBC. *Euro Residue II, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands*, page: 246-250, 1993.
- 88-** FELEK S, AKBULUT A, TCAK S, KILIÇ S. Tifo tedavisinde kloramfenikol ile siprofloksasinin karşılaştırılması. *Klinik Dergisi*. Cilt 5, sayı 2: 168-170, 1992.
- 89-** SÜNBUİL, M. Salmonella infeksiyonları. *İnfeksiyon*, sayfa: 39-43, 2001.
- 90-** CAZEMIER G, HAASNOOT W, STOUTEN P. Screening of chloramphenicol in urine, tissue, milk and eggs in consequence of the prohibitive regulation. Editors: HAAGSMA N, RUITER A. *Euro Residue III, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands*, page: 315-319, 1996.
- 91-** IVANOFF B, LEVINE MM, LAMBERT PH. Vaccination against typhoid fever: present status. *Bull World Health Organ*, 72: 957–971, 1994.
- 92-** ANONYMUS: WHO. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Thirty second report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Who Technical Report Series*, No. 763, Geneva, 1988.
- 93-** SETTEPANI JA. The hazard of using chloramphenicol in food animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184: 930–931, 1984.

- 94-** MOTTIER P, PARISOD V, GREMAUD E, GUY PA, STADLER RH. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 994: 75–84, 2003.
- 95-** DIBLIKOVA I, COOPER M, KENNEDY D, FRANEK M. Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofurantoin metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 540: 285–292, 2005.
- 96-** GANTVERG A, SHISHANI I, HOFFMAN M. Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine liquid chromatography–tandem mass spectrometry versus gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 483: 125–135, 2003.
- 97-** POSYNIK A, ZMUDZKI J, NIEDZIELSKA J. Evaluation of sample preparation for control of chloramphenicol residues in porcine tissues by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 483: 307–311, 2003.
- 98-** WARI SY, CHING AL, CHIEW KT, CHUA S. Rapid screening method for chloramphenicol in tissues using enzyme-linked immunosorbent assay. *Singapore Journal of Primary Industries*, 32: 46-51, 2005.
- 99-** BLANCHFLOWER WJ, CANNAVAN A, MCCRACKEN RJ, HEWITT SA, KENNEDY G. Determination of chloramphenicol in plasma, milk and tissue using liquid chromatography/thermospray mass spectrometry. Editors: HAAGSMA N, RUITER A, EYSENBERG PBC. *Euro Residue II, Conference on residues of veterinary drugs in food*, Veldhoven, The Netherlands, page: 196-200, 1993.
- 100-** DORPE CV, COX E, GODDEERIS B. Induction of group-specific monoclonal antibodies for penicillins. Editors: HAAGSMA N, RUITER A. *Euro Residue III, Conference on residues of veterinary drugs in food*, Veldhoven, The Netherlands, page: 387-391, 1996.
- 101-** SHEN J, ZHANG Z, YAO Y, SHI W, LIU Y, ZHANG S. A monoclonal antibody-based time-resolved fluoroimmunoassay for chloramphenicol in shrimp and chicken muscle. *Analytica Chimica Acta*; 575: 262-266, 2006.
- 102-** MUNOZ P, BLANCA J, RAMOS M, BARTOLOME M, GARCIA E, GOMEZ J, POZUELO MM. A versatile liquid chromatography–tandem mass spectrometry system for the analysis of different groups of veterinary drugs. *Analytica Chimica Acta*, 529: 137–144, 2005.
- 103-** NIESSEN WMA. Analysis of antibiotics by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 812: 53-75, 1998.
- 104-** WANG S, XU B, ZHANG Y, HE JX. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney. *Meat Science*, 82: 53–58, 2009.
- 105-** CLEMENTE M, HERMO MP, BARR´ON D, BARBOSA J. Confirmatory and quantitative analysis using experimental design for the extraction and liquid chromatography – UV, liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography – mass spectrometry/mass spectrometry determination of quinolones in turkey muscle. *Journal of Chromatography A*: 1135: 170–178, 2006.
- 106-** LI YL, HAO XL, JI BQ, XO CL, CHEN W, SHEN CY, DING T. Rapid determination of 19 quinolone residues in spiked fish and pig muscle by high performance liquid chromatography (HPLC) tandem mass spectrophotometry. *Food Additives and Contaminants*, Vol 26. No. 3: 306-313, 2009.
- 107-** SCORTICHINI G, ANNUNZIATA L, GIROLAMO V, BURATTI R, GALARINI R. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay screening for quinolones in egg, poultry muscle, feed samples. *Analytica Chimica Acta*, 637: 273-278, 2009.

- 108-** ANONYMUS: Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Enro/cipro. Art No: R 3111 R-Biopharm GmbH. Darmstadt. Germany. www.r-biopharm.com. R-Biopharm. Ridascreen Test kits, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany, 2006.
- 109-** LOLO M, PEDREIRA S, MIRANDA JM, VAZQUEZ BI, FRANCO CM, CEPEDA A, FENTE C. Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue. *Food Additives and Contaminants*, 23 (10): 988–993, 2006.
- 110-** CHARRIERE R, LEISER W, DOUSSE R. HPLC methods for the determination of some Quinolones in fish and animal tissues. Editors: HAAGSMA N, RUITER A, EYSENBERG PBC. *Euro Residue II, Conference on residues of veterinary drugs in food*, Veldhoven, The Netherlands, page: 241-245, 1993.
- 111-** CENGİZ M. Bakterilerde kinolon direncinin genetiği. *Uludag University Journal of Faculty of Veterinary Medicine*, 29; 1: 55-60, 2010.
- 112-** CHEN J, XU F, JIANG H, HOU Y, RAO Q, GUO P, DING S. A novel quantum dot-based fluoroimmunoassay method for detection of enrofloxacin residue in chicken muscle tissue. *Food Chemistry*, 113: 1197–1201, 2009.
- 113-** SURESHKUMAR V, VENKATEWARAN KV, JAYASUNDAR S. Interaction between enrofloxacin and monensin in broiler chickens. *Veterinary & Human Toxicology*, 46 (5): 242-245, 2004.
- 114-** ANADON A, LARRANAGA MRM, DIAZ MJ, CRUZ MLF, FERNANDEZ MC, MARTINEZ MA, ITURBE J. Bioavailability and residues of enrofloxacin in pigs. Editors: HAAGSMA N, RUITER A. *Euro Residue III, Conference on residues of veterinary drugs in food*, Veldhoven, The Netherlands, page: 199-202, 1996.
- 115-** XU W, ZHU X, WANG X, DENG L, ZHANG G. Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 254: 1–8, 2006.
- 116-** HOPKINS KL, DAVIES RH, THREFALL EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25: 358-373, 2005.
- 117-** LEE YJ, CHO JK, KIM KS, TAK RB, KIM AR, KIM JW, IM SK, KIM BH. Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. *The Journal of Microbiology*, 43 (5): 391-397, 2005.
- 118-** MILES TD, MCLAUGHLIN W, BROWN PD. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research*, 2: 7-9, 2006.
- 119-** ORDEN JA, RUIZ-SANTA-QUITERIA JA, CID D, DIEZ R, MARTINES S, DE LA FUENTE R. Quinolone resistance in potentially pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy ruminants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 421-424, 2001.
- 120-** HOOPER D. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance, Update*, 2: 38-55, 1999.
- 121-** INTORRE L, VANNI M, DI BELLO D, PRETTI C, MEUCCI V, TOGNETTI R, SOLDANI G, CARDINI G, JOUSSON O. Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30: 464-469, 2007.
- 122-** KATO JI, SUZUKI H, IKEDA H. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 25676-25684, 1992.
- 123-** KHAN AA, NAWAZ MS, WEST CS, KHAN SA, LINT J. Isolation and molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* from poultry litter. *Poultry Science*, 84: 61-66, 2005.

- 124-** ROBICSEK A, JACOBY GA, HOOPER D. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Disease*, 6: 629-640, 2006.
- 125-** STAVOE AKH. Plasmid-mediated quinolone and fluoroquinolone resistance. *MMG 445 Basic Biotechnology eJ.*, 2: 154-159, 2006.
- 126-** RANDALL LP, WOODWARD MJ. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Research in Veterinary Science*, 72: 87-93, 2002.
- 127-** ALEKSHUN MN, LEVY SB. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other chemicals. *Trends in Microbiology*, 7 (10): 410-413, 1999.
- 128-** CASTIGLIONI S, ROMATI F, MILLER K, BURNS BP, ZUCCATO E, CALAMARI D, NEILAN BA. Novel homologs of the multiple resistance regulator *marA* in antibiotic-contaminated environments. *Water Research*, 42: 4271-4280, 2008.
- 129-** PARK YH, YOO JH, HUH DH, CHO YK, CHOI JH, SHIN WS. Molecular analysis of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* on the aspect of gyrase and multiple antibiotic resistance (*mar*) genes. *Yonsei Medical Journal*, 39 (6): 534-540, 1998.
- 130-** F`ABREGA A, C`ESPEDES, SJ, SOTO S, VILA J. Quinolone resistance in the food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 307–315, 2008.
- 131-** LI C, WANG Z, CAO X, BEIER R, ZHANG S, DING S, LI X, SHEN J. Development of an immunoaffinity column method using broad-specificity monoclonal antibodies for simultaneous extraction and cleanup of quinolone and sulfonamide antibiotics in animal muscle tissues. *Journal of Chromatography A*, 1209: 1-9, 2008.
- 132-** ANONYMUS: IN EC..EC (1990) EUROPEAN COUNCIL REGULATION 90/2377/EEC OF 26 JUNE 1990. Laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, as amended. *Official Journal. L. 224.* pp. 1-8, 18/08/1990.
- 133-** ANONİM: T.C.TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI KORUMA VE KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ. Türk Gıda Kodeksi. Hayvansal kökenli gıdalarda veteriner ilaçları maksimum kalıntı limitleri tebliği. 2002/30, R.G.28.04.2002-24739, 2002.
- 134-** ELLERBROEK L. Microbial and chemical detection methods for residue of quinolones and related substances in animal tissue. Editors: HAAGSMA N, RUITER A, EYSENBERG PBC. *Euro Residue II, Conference on residues of veterinary drugs in food*, Veldhoven, The Netherlands, page: 280-284, 1993.
- 135-** WU LG, QIN WD. Separation of quinolones by capillary electrophoresis. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 42: 66–69, 2006.
- 136-** LI JQ, FENG XH, DONG C. Study on the temperature character of the optic-fiber surface-plasmon wave sensor. *Spectroscopy Spectral Analysis*, 23: 31–34, 2003.
- 137-** ABJEAN JP, DELEPINE B, HURTAUD-PELLE D, JUHEL-GAUGAIN M, ROUDAUT B. Qualitative or quantitative methods for residue analysis. A strategy for drug residue monitoring. Editors: GINKEL LA, RUITER A. *Euro Residue IV, Conference on residues of veterinary drugs in food*, Veldhoven, The Netherlands, page: 176-179, 2000.
- 138-** COOPER K, SAMANOVA J, PLUMPTON L, ELLIOT C, KENNEDY G. Enzyme immunoassay for semicarbazide-the nitrofurantoin metabolite and food contaminant. *Analytica Chimica Acta*, 592: 64-71, 2007.
- 139-** ANONYMUS: NAFDAC. Ban on the use of nitrofurantoin in live stock and poultry feeds. National Agency for food and drug administration and control, Alert No. 10, Lagos, 1996.

- 140-** VERDON E, COUEDOR P, SANDERS P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry—In house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. *Analytica Chimica Acta*, 586: 336–347, 2007.
- 141-** MOTTIER P, KHONG S, GREMAUD E, RICHOZ J, DELATOUR T, GOLDMANN T, GUY PA. Quantitative determination of four nitrofurantoin metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1067: 85–91, 2005.
- 142-** LEITNER A, ZOLLNER P, LINDNER W. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 939: 49–58, 2001.
- 143-** ANONYMUS: Food standards Australia New Zealand nitrofurans in prawns. A toxicological review and risk assessment. Technical report series No: 31. November 2004, <http://www.foodstandards.gov.au>, 2004.
- 144-** ANONIM: Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of nitrofurantoin AOZ. Art. No. R 3701 R-Biopharm GmbH. Darmstadt, Germany. www.r-biopharm.com. R-Biopharm. Ridascreen test kits, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany, 2006.
- 145-** HAAGSMA N. Stability of veterinary drug residues during storage, preparation and processing. Editors: HAAGSMA N, RUITER A, EYSENBERG PBC. Euro Residue II, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, page: 41-49, 1993.
- 146-** BLANCHFLOWER WJ, MCCRACKEN RJ, KENNEDY DG. Detection of furazolidone in muscle using liquid chromatography/thermospray mass spectrometry. Editors: HAAGSMA N, RUITER A, EYSENBERG PBC. Euro Residue II, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, page: 201-205, 1993.
- 147-** CHANG C, PENG DP, WU JE, WANG YL, YUAN ZH. Development of an indirect competitive ELISA for the detection of furazolidone marker residue in animal edible tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (5): 1525-1531, 2008.
- 148-** HORNE E, CADOGAN A, O'KEEFE M. Metabolites in pig liver by high performance liquid chromatography with uv and mass spectrometric detection. Editors: HAAGSMA N, RUITER A. Euro Residue III, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, page: 510-515, 1996.
- 149-** MCCRACKEN RJ, VAN RHIJN JA, KENNEDY DG. Transfer of nitrofurantoin residues from parent broiler breeder chickens to broiler progeny. *British Poultry Science*, June; 46 (3): 287-292, 2005.
- 150-** ANONYMUS: Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. OJ L 221, pp. 8-36, 2002.
- 151-** ANONYMUS: EU AND NATIONAL REFERENCE LABORATORY FOR RESIDUES. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, AV 014-01 Version V06, 2008.
- 152-** BRABANDER HFD, POTTIE G, COUTHEYN D, SMETS F. To quantify or to qualify and quantify? That's the question. Editors: HAAGSMA N, RUITER A. Euro Residue III, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, page: 283-287, 1996.
- 153-** ANONIM: Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of chloramphenicol. Art. No. R 1505 R-Biopharm GmbH. Darmstadt, Germany. www.r-biopharm.com. R-Biopharm. Ridascreen test kits, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany, 2006.

- 154-** ALKAN Y, GÖNÜLALAN Z, ÜSTÜN F. Amasya ilinde satışa sunulan beyaz peynirlerde Aflatoxin M1, rutubet ve asidite değerleri üzerine bir araştırma. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences), 15(2): 91-98, 2006.
- 155-** ORUÇ H, CENGİZ M, UZUNOĞLU İ. Occurance of Aflatoxin and T-2 toxin in feed and raw ingredients used for animal feeding stuff. Uludag University Journal of Faculty Veterinary Medicine, 26 (1-2): 1-5, 2007.
- 156-** CENGİZ M, ORUÇ HH, UZUNOĞLU İ, SONAL S. Ochratoxin A levels in different types of bread and flour. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 26 (1-2): 7-10, 2007.
- 157-** ORUÇ HH, CENGİZ M, BAĞDAŞ D, UZUNOĞLU İ. Sığır etlerinde zeranol, dietilstilbestrol, klenbuterol, 17β-östradiol ve testosteron kalıntıları. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 26 (1-2): 11-15, 2007.
- 158-** GÜNŞEN U, OVALI BB, COŞKUN Y. Et ürünlerinde bazı anabolizan madde kalıntı varlığının ELISA tekniği ile belirlenmesi. 2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi (Uluslar arası katılımlı), İstanbul, sayfa: 747-759, 2006.
- 159-** WANG L, WANG S, ZHANG J, LIU J, ZHANG Y. Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for sulphamethazine residues in edible animal foods: investigation of the effects of the analytical conditions and the sample matrix on assay performance. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390: 1619–1627, 2008.
- 160-** RODZIEWICZ L, ZAWADZKA I. Rapid determination of chloramphenicol residues in milk powder by liquid chromatography–elektrospray ionization tandem mass spectrometry. Talanta, 75: 846–850, 2008.
- 161-** ANONYMUS: IUPAC. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. Pure & Applied Chem., 67: 331, 1995.
- 162-** JULICHER B, GOWIK P, UHLIG S. Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. Analyst, 120: 173, 1998.
- 163-** GOWIK P, JULICHER B, UHLIG S. Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Journal of Chromatography, 716: 221, 1998.
- 164-** ANONYMUS: ISO 11843: 1997. Saptama yeteneği-Bölüm 1: Koşullar ve tanımlamalar, Bölüm 2: Linear kalibrasyon durumunda metodoloji, 1997.
- 165-** BAYDAN E, FİLAZİ A, KUM C, SEKKİN S. Etlik piliçlerde pişirme ve dondurma işlemlerinin ilaç kalıntıları üzerine etkileri: enrofloksasin üzerine pişirme ve farklı sürelerde soğukta depolamanın etkisi. Türk Veteriner Hekimliği Dergisi, 71: 19-22, 2000.
- 166-** SHAKILA RJ, VYLA SAP, KUMAR RS, JEYASEKARAN G, JASMINE GI. Stability of chloramphenicol residues in shrimp subjected to heat processing treatments. Food Microbiology, 23: 47-51, 2006.
- 167-** ANONYMUS: THE VETERINARY MEDICINES DIRECTORATE. AN EXECUTIVE AGENCY OF THE MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES & FOOD. Annual report on surveillance for veterinary residues in 1998, 1999.
- 168-** NINO AMM. Implementation of residue programmes in South America. Editors: GINKEL LA, RUITER A. Euro Residue IV, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, page: 114-121, 2000.
- 169-** BRYNES SD, SUNDLOF SF, VILIM A, LAMBERT G, YONG MS, FITZPATRICK SC. International harmonization of maximum residue levels for veterinary drugs via dietary intake estimates. Editors: HAAGSMA N, RUITER A. Euro Residue III, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, page: 296-300, 1996.

- 170-** MAHMUTOĞLU T. Gıda Endüstrisinde “ Güvenli Gıda” Üretmek. ODTÜ Yayıncılık, Ankara, sayfa: 90-106, 2007.
- 171-** ANONİM: T.C. TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI KORUMA VE KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ. Kaçak ve illegal ilaç. B.12.0.KKG.0.20/109-01-11624-036396: 36, 2009.
- 172-** ANONİM: T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI. 18 Kasım 2009 Avrupa antibiyotik farkındalık günü el ilanı, Ankara, 2009.
- 173-** VINAS P, CAMPILLO N, CARRASCO L, CORDOBA H. Analysis of nitrofuran residues in animal feed using liquid chromatography and photodiode-array detection. *Chromatographia*, 65: January (No. 1/2), 85-89, 2007.
- 174-** ANONYMUS: VETERINARY RESIDUES COMMITTEE. Annual report on surveillance for veterinary residues in food in the UK, 2008.
- 175-** ZHANG S, ZHOU J, SHEN J, DING S, LI J. Determination of chloramphenicol residue in chicken tissues by immunoaffinity chromatography cleanup and gas chromatography with a microcell electron capture detector. *Journal of AOAC International*, March-April; 89(2): 369-373, 2006.
- 176-** ANONİM: T.C.TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI. KORUMA VE KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ. Gıda Değeri Olan Hayvanlara Uygulanması Yasak Olan Maddeler Hakkında Tebliğ. 19.12.2002 / 24968. 2002/68, 2002.
- 177-** ANONYMUS: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE, OFFICE OF PUBLIC HEALTH SCIENCE. Screening for chloramphenicol by ELISA, 03/17/2006, 2006.
- 178-** ANONYMUS: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE, OFFICE OF PUBLIC HEALTH SCIENCE. Screening for furazolidone and furaltadone metabolites by ELISA, 03/07/2005, 2005.
- 179-** ANONYMUS: LABORATOIRE DES MEDICAMENTS VETERINAIRES. LABORATOIRE COMMUNAUTAIRE DE REFERENCE. Chloramphenicol identification by liquid chromatography tandem-mass spectrometry, Technical Notice, 2004.
- 180-** RAMOS M, MUNOZ P, ARANDA A, RODRIGUEZ I, DIAZ R, BLANCA J. Determination of chloramphenicol residues in shrimps by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 791: 31–38, 2003.
- 181-** ANONİM: ZİVAK ZV–1015–0200–30 LC-MS/MS analiz seti doku matriksinde nitrofuran grubu antibiyotikler kalıntı analizi talimatı (ZV–1015–0200–30-KK-T Rev.01), 2009.
- 182-** CHOMA MI. TLC separation of flouroquinolones: searching for better selectivity. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26: 2673-2685, 2003.
- 183-** AL-MOSTAFA HZ, AL-GHAMADI MS. Use of norfloxacin in poultry production in the eastern province of Saudi Arabia and its possible impact on public health. *International Journal of Environmental Health Research*, 10: 291-299, 2000.
- 184-** CHANDER Y, KUMAR K, GOYAL SM, GUPTA SC. Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *Journal of Environmental Quality*, 34: 1952-1957, 2005.
- 185-** THIELLE-BRUHN S, BECK IC. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere*, 59: 457-465, 2005.
- 186-** LEVY BS. Antimicrobial resistance: bacteria on defence. *British Medical Journal*, 317: 612-613, 1998.
- 187-** GUSTAVSON E, BJURLING P, DEGLEAN J, STRRENSJO A. Analysis of lactam antibiotics using a microbial receptor protein based biosensor assay. *Food and Agricultural Immunology*, 14: 121-131, 2002.

- 188-** BERTINI S, FIERRERO S, BERNY P. A new improved high performance thin layer chromatography (HPTLC) method for detection of ionophore antibiotics in feed and animal tissues. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26: 147-156, 2003.
- 189-** TEMAMOĞULLARI F, KAYA S. Ankara piyasasında satılan sütlerde bazı antibiyotik kalıntılarının ince tabaka kromatografisi ve biyootografik yöntemle saptanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (2): 187-191, 2010.
- 190-** BOOTH JM, HARDING F. Testing for antibiotic residues in milk. *Veterinary Research Dec*; 119 (23): 565-569, 1986.
- 191-** AKAR F. Tavuk eti ve karaciğerlerinde bazı antibiyotik kalıntılarının araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 41 (2): 199-207, 1994.
- 192-** YÜKSEK N. Etilerde antibiyotik kalıntılarının aranması üzerinde çalışmalar. *Journal of Faculty Veterinary Medicine*, 20: 85-90, 2001.
- 193-** GARCIA-OVANDO H, GORLA N, WEYERS A, UGNIA L, MAGNOLI A. Simultaneous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36: 93-98, 2004.
- 194-** BALIZS G, HEWITT A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 492: 105–131, 2003.
- 195-** GANG HX, YI L, XING ZQ, LIN X. Determination of thirteen antibiotics residues in manure by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36 (9): 1162–1166, 2008.
- 196-** CHO HJ, YI H, CHO SM, LEE DG, ATY AMAE, SHIN HC. Simultaneous determination of fluoroquinolone residual levels in chicken eggs by liquid chromatography, American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting, AAPS Journal 10 (S2), 2039 http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2008/AAPS2008-002039.PDF, 2008.
- 197-** BERGNER-LANG B, BOURGEOIS B, EDELHAUSER M, KLEIN E, LIPPOLD R, MOLLERS M, PLETSCHER D. Chemical Drug Residue Analysis of Inhibitor-positive Samples of Meat, Kidney and Liver. Editors: HAAGSMA N, RUITER A, EYSENBERG PBC. Euro Residue II, Conference of Residues of Veterinary Drugs in Food. Veldhoven, The Netherlands. Sayfa:186-191, 1993.
- 198-** ANONYMUS: THE VETERINARY MEDICINES DIRECTORATE. AN EXECUTIVE AGENCY OF THE MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES & FOOD. Annual report on surveillance for veterinary residues in 1999, 2000.
- 199-** ANONYMUS: THE VETERINARY MEDICINES DIRECTORATE. AN EXECUTIVE AGENCY OF THE MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES & FOOD. Annual report on surveillance for veterinary residues in 2000, 2001.
- 200-** ÖBEKÇİ J. Tavuk eti ve karaciğerlerinde tetrasiklin grubu antibiyotiklerin HPLC ile saptanması. Uzmanlık Tezi. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 2002.
- 201-** SHAREEF AM, JAMEL ZT, YONIS KM. Detection of antibiotic residues in stored poultry products. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Proceedings of the 5th Scientific Conference, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Vol. 23, Supplement I (45-48)*, 2009.
- 202-** CROUBLES S, OKERMAN L, VANOOSTHUYZE K, HOOF JV, PETEGHEM C. Confirmation of tetracycline residues by HPLC after microbiological and ELISA screening of kidney and meat tissue. Editors: HAAGSMA N, RUITER A. Euro Residue III, Conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands, page: 362-366, 1996.

- 203-** DEGROODT JM, BUKANSKI BW, GROOF J, BEERNAERT H, SREBRNIK S. Chloramphenicol and nitrofurantoin residue analysis by HPLC and photodiode array detection in meat and fish. *Journal of Liquid Chromatography*, 15 (13): 2355-2371, 1992.
- 204-** ERDOĞDU AT, KOÇYİĞİT Y, ÖZDEMİR G, COŞKUN Y. Tüketime sunulan sığır ve koyun etlerinde tetrasiklin türevi antibiyotiklerin kalıntılarının belirlenmesi. 3. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi Kitabı, Bursa, sayfa: 175, Poster, 2009.
- 205-** O' KEEFFE M, CONNEELY A, COOPER KM, KENNEDY DG, KOVACSICS L, FODOR A, MULDER PPJ, VAN RHIJN JA, TRIGUEROS G. Nitrofurantoin antibiotic residues in pork. The FoodBRAND retail survey. *Analytica Chimica Acta*, 520: 125-131, 2004.
- 206-** TITTELMIER SA, RIET JVD, BURNS G, POTTER R, MURPHY C, ROURKE W, PEARCE H, DUFRESNE G. Analysis of veterinary drug residues in fish and shrimp composites collected during the Canadian total diet study, 1993-2004. *Food Additives and Contaminants*, January 24 (1): 14-20, 2007.
- 207-** EDDER P, VARGAS S, ORTELLI D, CORVI C. Analysis of nitrofurantoin metabolites in food by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41: 1608-1614, 2003.
- 208-** RYBINSKA K, POSTUPOLSKI J, SZCZESNA M. Residues of antibiotics and other inhibitory substances in milk. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 46: 239-241, 1995.
- 209-** ACET A, ATEŞ M, ERGANİŞ O. Hayvansal dokularda antibiyotik kalıntılarının agar difüzyon tekniği ile tayini. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3: 197-205, 1987.
- 210-** ANONYMUS: FEDERAL OFFICE OF PUBLIC HEALTH. Seafood and poultry / nitrofurantoin antibiotics. Maximum concentrations for residues of nitrofurantoin antibiotics in foodstuffs of animal origin, circular no: 78, 9 August 2002, 2002.
- 211-** UNUSAN N. Occurrence of chloramphenicol, streptomycin and tetracycline residues in ultra-heat-treatment milk marketed in Turkey. *International Journal of Food Science and Nutrition*, Mar 28: 1-6, 2009.
- 212-** ŞANLI Y, KAYA S, YAVUZ H, AYDIN N, AKAR F, DOĞAN A. Süt örneklerinde kloramfenikol kalıntıları. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 38 (3): 402-416, 1991.
- 213-** DOKUZLU C, TAYAR M. Bursa ve çevresinde çiğ sütlerde antibiyotik varlığının belirlenmesi. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 31 (2): 61-64, 2000.
- 214-** DEMET Ö, ACET A, TIRAŞ B. Konya'da faaliyet gösteren çeşitli mandıralardan toplanan süt örneklerinde kloramfenikol ilaç kalıntılarının araştırılması. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1): 35-37, 1992.
- 215-** ÖNAL A, AYDIN N, AYAZ Y, İŞCAN D, SAVAŞ N. Süt ve etlerde bulunan bazı antibiyotiklerin çeşitli yöntemlerle saptanması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi*, 7: 48-51, 1993.
- 216-** REYBROECK W. Residues of antibiotics sulphonamides in honey on the Belgian market. *Apiacta* 38: 23-30, 2003.
- 217-** LIGUORO MD, CIBIN V, CAPOLONGO F, SORENSEN BH, MONTESISSA C. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*, 52: 203-212, 2003.
- 218-** YANG S, CARLSON K. Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. *Water Research*, 38: 3155-3166, 2004.

TEŞEKKÜR

Bu tezi yazarken bana sevgisini, ilgisini, sabrını ve desteğini hiç tereddüt etmeden esirgemenen gösteren canım eşim, dünya'nın en tatlı annesi Zeynep YIBAR'a, bana her türlü manevi desteğini esirgemeyen danışmanım Prof.Dr.Ece SOYUTEMİZ'e ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim Prof.Dr.Mustafa TAYAR'a, yazım aşamasında çok emek harcayan Doç.Dr.Figen ÇETİNKAYA'ya, laboratuvarlarını bana açarak kahrımı çeken, tüm bilgi ve desteklerini benimle paylaşan Bursa Gıda Araştırma ve Kontrol Merkez Enstitüsü eski Müdürü şimdi, Bursa Osmangazi Belediye Başkan Yardımcısı olan, Kemal BAYRAKTAR'a, Bursa Gıda Araştırma ve Kontrol Merkez Enstitüsü Hayvansal Gıdalar Bölümü şefi Ali ÖZCAN ve bölüm çalışanı veteriner hekim Mehmet KARACA'ya, İstanbul Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü Farmakoloji Bölümü şefi Bülent OKUTAN'a ve bölüm çalışanı kimyager Fatih ALKAN'a, Fakültemiz Farmakoloji Bölümü öğretim üyesi Doç.Dr Hasan Hüseyin ORUÇ'a teşekkürler.

Canım Kızım Yağmur'a...

ÖZGEÇMİŞ

27.06.1981 tarihinde Bursa'da doğdum. İlkokulu Bursa Özel İnal Ertekin İlköğretim Okulu'nda okudum. Okulumuzun Bursa ve Kafkas yöreleri halk dansları ekiplerinde Türkiye ve Avrupa'da birçok organizasyonda yer aldım. Ortaokulun hazırlık, orta 1 ve orta 2 kısmını Özel İhsan Çizakça Lisesi'nde, orta 3'ü de Bursa Ticaret ve Sanayi İlköğretim Odası İlköğretim Okulu'nda okudum. Lise eğitimimi Bursa Cumhuriyet Yabancı Dil Ağırlıklı Süper Lise Bölümü'nde sürdürdüm. 2000 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde beş yıllık bir eğitime ve 2004 yılında dört yıllık Eskişehir Anadolu Üniversitesi İşletme Bölümü'ne başladım. 2005 yılında Veteriner Fakültesi'nden mezun olarak kasım ayında askere gittim. Gemlik Askeri Veteriner Okulu'nda 307. dönem birincisi Veteriner Hekim Asteğmen oldum. Askerliğimi gıda kontrol subayı olarak İmralı Jandarma Ada Güvenlik Komutanlığı'nda yapıp bitirdikten sonra özel sektörde önce Bandırma Banvit kesimhanede çalışma hayatına başladım. 2007 Ocak ayında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü'nde doktora başladım. Devamında Yankı Yemek'te kalite sistem yöneticisi ve Real Hiper Market-Bursa'da sorumlu veteriner hekim olarak çeşitli pozisyonlarda çalıştım. 2007 yazında dünyalar kadar çok sevdiğim eşim Zeynep ile evlendim. 2008 Ocak ayında doktoramı sürdürdüğüm bölümümde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başlayarak özel sektördeki görevimden ayrıldım. 2008 yazında Anadolu Üniversitesi İşletme Bölümü lisans diplomamı aldım. 2 Haziran 2010 tarihinde dünyalar tatlısı kızımız Yağmur dünyaya geldi.