

## Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) yemlerle verilen enrofloksasin'in serum ve dokulardaki düzeylerinin incelenmesi

Gürdal DAĞOĞLU<sup>1</sup>

Oya KELEŞ<sup>2</sup>

Oktay ÖZKAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı - VAN

<sup>2</sup> İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı - İSTANBUL

<sup>3</sup> Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı - KARS

### ÖZET

Florokinolon grubu bir antibiyotik olan enrofloksasin'in, balıklarda sağaltım modeline uygun kullanımı ile ortaya çıkan doku ve serum konsantrasyonları incelendi. Bu amaçla enrofloksasin yemlerle 10 mg/kg dozda 10 gün süresince verildi. İlacın verildiği dönem ve bunu izleyen 15 gün süresince kan ve doku örnekleri alındı ve enrofloksasin düzeyleri HPLC ile belirlendi.

Serum ve dokulardaki enrofloksasin konsantrasyonları ilacın verildiği süre içinde zamana bağlı olarak yükselme eğilimi gösterdi ve uygulama döneminin 6-11. günlerinde en yüksek düzeylere ulaştı. Bunu takiben serumdaki düzeyler dokulara oranla hızlı bir şekilde azaldı ve enrofloksasin rezidüleri serumda 13. gün, karaciğerde 15. ve böbreklerde 16. günde saptanamayan düzeylere düştü. Buna karşın 25. günde, sadece kaslarda  $0.2 \pm 0.01$  ppm rezidü bulundu. Elde edilen bulgular enrofloksasin rezidü düzeylerinin diğer dokulara oranla böbreklerde daha yüksek, kaslarda ise daha uzun süre kaldığını belirledi.

**Anahtar kelimeler:** Enrofloksasin, alabalık, doku, serum.

*Investigation of serum and tissue levels of enrofloxacin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from medicated feed*

### SUMMARY

Concentration of fluoroquinolone antimicrobial agent enrofloxacin in serum and tissue that was originated therapy model used in fish was inspected. Enrofloxacin was administered in the feed at doses of 10 mg/kg body weight for 10 days. Blood and tissue samples were taken during 10 day dosing and subsequent 15 day post-dosing periods and enrofloxacin concentrations were determined by HPLC.

Serum and tissue drug concentrations increased with time during treatment and reached maximum values at 6-11 days after termination of enrofloxacin treatment. Subsequently, levels in serum decreased more rapidly than that in tissue and enrofloxacin residues decreased to undetectable levels at 13 day in serum, 15 day in liver and 16 day in kidney after dosing. In contrast, at 25 day residues were only detected concentration of  $0.2 \pm 0.01$  ppm in muscles. These findings established that enrofloxacin residues levels were higher in kidney and persisted for longer in muscles than other tissue

**Key words:** Enrofloxacin, Rainbow trouts, tissue, serum

### GİRİŞ

Kültür balıkçılığı 25 milyon ton üretim kapasitesi ile en hızlı gelişen bir sektör olmasına rağmen verimliliğini sınırlandıran ana unsur, patojen mikroorganizmalardan kaynaklanan bakteriyel hastalıklardır. Stres koşullarına bağlı olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açan bu hastalıkların kontrol altına alınması amacıyla FDA tarafından kullanımı önerilen çok az sayıda terapötik ajan (oksitetrasiklin, sülfamerazin ve ormetoprim-sülfadimetoksin kombinasyonu) bulunmaktadır. Bakteriyostatik özellikteki bu bileşiklerin sürekli kullanıldığı durumlarda ise başta *Aeromonas* türleri olmak üzere birçok mikroorganizmaya karşı direnç geliştiği bildirilmektedir. Bu durumda etkin bir sağaltım gerçekleştirmek için bakterisit aktiviteye sahip ilaçlara gereksinim duyulmuş ve özellikle Avrupa ülkelerinde kinolon ve florokinolon gibi geniş etki spektrumlu bileşiklerin kullanımı gündeme gelmiştir (2,13, 17). Florokinolonlardan enrofloksasin ve siprofloksasin ile yapılan araştırmalar sonucunda bu bileşiklerin *Vibrio*, *Aeromonas* ve *Yersinia* türleri gibi önemli patojenlere karşı güçlü antibakteriyel etkilerinin yanısıra sağaltım için uygun farmakokinetik özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir (3,4,5,7). Florokinolonlar çok düşük konsantrasyonlarda bile DNAjiraz enzimini inhibe ederek DNA'nın sentezi ve kalıbının çıkarılmasını önlemesi ve hücre hacminde anormal bir genişlemeye yol açması gibi işlevleri ile bakterisit etkiye neden olur. Bunun yanısıra bileşiğe karşı direnç gelişiminin kromozomal nitelikte oluşundan dolayı dirençin yavaş şekillendiği ve diğer antibiyotiklere dirençli olan bakterilerde

de aktivite sağladığı bildirilmektedir (10,12,16). Terapötik özelliklerine rağmen konakçı hücrelerinde DNA hasarından kaynaklanan mutasyon ve hücre ölümüne yol açabilecekleri ve bunun sonucu olarak insan ve hayvan hücrelerinde genetik değişim, mutajenik ve karsinojenik etki yaratabilecekleri ileri sürülmektedir. Ayrıca florokinolon türevlerinin kıvrıkdak dokunun gelişiminin bozulması artropatilerin şekillenmesi gibi ortak toksik özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Bundan dolayı büyüme döneminde olan insan ve hayvanlar ile damızlıklarda kullanımı sakıncalıdır. Yüksek dozlarda ise anemi, antiandrojenik aktivite, kataraktogenez, hepatotoksisite ve nefrotoksisiteye neden olduğu saptanmıştır (1, 8,16).

Balıklarda herhangi bir ksenobiyotiğin eliminasyon kapasitesinin memelilere oranla daha düşük olduğu (15) ve ortaya çıkan rezidülerin sağlık sorunlarına yol açabileceği göz önüne alınarak enrofloksasinin terapötik amaçla kullanımlarından kaynaklanabilecek doku rezidü düzeyleri incelendi.

### MATERYAL VE METOT

Araştırmamızda 6 aylık ve ortalama 250 g ağırlığında 95 adet alabalık kullanıldı. Balıklar, su sıcaklığı 12°C dolayında olan ve sürekli sirkülasyon halinde bulunan 150 litre kapasiteli 4 adet tankta tutuldu. Bir haftalık adaptasyon süresini takiben tartımlar yapıldı. Balıkların vücut ağırlığının % 1'i oranında yem yediği (13) göz önüne alınarak bulunan enrofloksasin miktarları yemlere ilave edildi ve yemler pelet haline getirildi. Balıklar, 10 mg/kg/vücut ağırlığı dozda enrofloks-

şasin içeren yemler ile 10 gün süresince beslendi. Yemlerin verilmesinden sonraki 4. ve 8.saatler ile 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 20. ve 25. günlerde 5'er adet balık, benzokain içeren dilüe solüsyonda tutularak anestezi edildi ve caudal venden kan alındı. Bu işlemi takiben ötanazi yapılarak doku örnekleri elde edildi. Serum ve dokular analiz yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Serum ve doku örneklerinin enrofloksasin konsantrasyonları yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) ile saptandı (10). Ekstraksiyon için 200 µl serum ve 1 g homojenize edilmiş doku örneği alındı. Örneklerin üzerine 25 µl internal standart (10 µg enrofloksasin/ml) ve 5 ml metanol ilave edilerek 15 dk vorteks ile karıştırıldı ve yüksek devirde 10 dk süresince santrifüj edildi. Üst fazdan 1 ml alınarak bir tüpe aktarıldı ve üzerine 6 ml diklorometan kondu. Vortekste 1 dk karıştırıldıktan sonra 1000 devirde 10 dk süresince tekrar santrifüj edildi. Elde edilen organik faz 40°C de azot gazı altında uçuruldu. Oluşan rezidü 5 ml mobil fazda çözündürülerek 20 µl'si HPLC'ye uygulandı.

HPLC'nin çalışma koşulları:

Dedektör: UV, 279 nm

Kolon : C 8 İnetersil (4 mm x 1.25 cm)

Mobil faz : % 86 fosforik asit

Akış hızı : 2 ml/dk

Enrofloksasinin tutunma zamanı 3.6 dk, saptanma limiti 5 ng/ml, geri kazanma oranı ise %90 olarak bulundu.

#### BULGULAR

Enrofloksasinin 10 mg/kg dozda 10 gün süresince yemlerle verilmesi ve bu uygulamayı izleyen 15 günlük dönemde alabalıkların serum ve dokularındaki ilaç konsantrasyonları Tablo 1'de, konsantrasyon-zaman dağılımı ise Şekil 1'de gösterilmiştir.

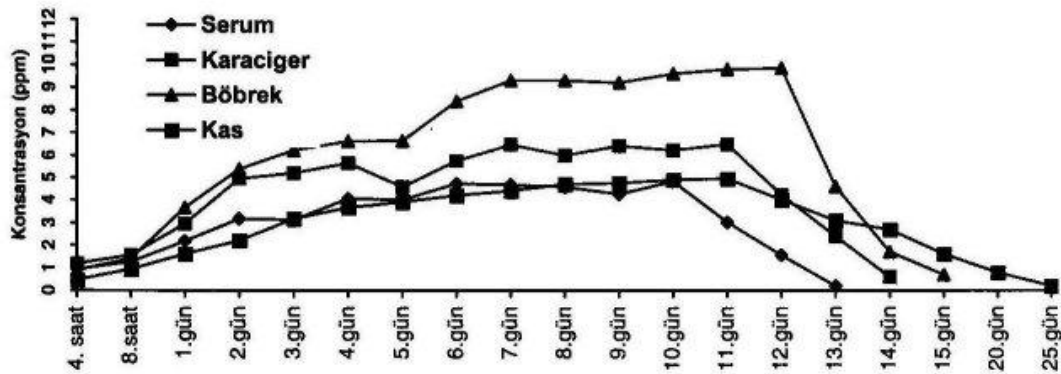
Bireysel analiz sonuçları incelendiğinde enrofloksasin içeren yemlerin verilmesinden 4 saat sonra ilaç serum, karaciğer, böbrek ve kas dokusunda saptandı. Enrofloksasinin uygulama periyodu süresince serum ve dokulardaki konsantrasyonları zamana bağlı olarak yükselme eğilimi gösterdi ve

uygulamaya son verilmesiyle serumdaki düzeylerin dokulara oranla hızlı bir şekilde azaldığı belirlendi.

Enrofloksasinin verilmesini izleyen 4.saatte serumdaki ilaç konsantrasyonları  $0.95 \pm 0.07$  ppm, karaciğerde  $1.2 \pm 0.04$  ppm, böbrekte  $0.9 \pm 0.07$  ppm ve kas dokusunda  $0.47 \pm 0.02$  ppm bulunmasına karşın 10.günde elde edilen değerler sırasıyla  $4.82 \pm 0.24$ ,  $6.22 \pm 0.18$ ,  $9.6 \pm 0.2$  ve  $4.9 \pm 0.3$  ppm'dir. Enrofloksasin konsantrasyonlarının incelendiği süre içinde en yüksek ilaç düzeyleri; serumda 10.günde ( $4.82 \pm 0.24$  ppm), karaciğer ( $6.48 \pm 0.21$  ppm) ve kas dokusunda ( $4.95 \pm 0.27$  ppm) 11.günlerde, böbrekte ise 12.günde ( $9.85 \pm 0.32$  ppm) bulundu ve tüm dokular arasında en yüksek ilaç konsantrasyonuna böbreklerde rastlandı. Enrofloksasin içeren yemlerin verilmesinden sonra serumda 12.günden ( $0.2 \pm 0.01$  ppm), karaciğerde 14. günden ( $0.6 \pm 0.02$  ppm) ve böbrekte 15.günden ( $0.7 \pm 0.1$  ppm) sonra rezidü saptanmadı. Kaslarda ise 25. günde  $0.2 \pm 0.01$  ppm rezidü bulundu.

Tablo 1. Balıkların serum ve dokularındaki enrofloksasin düzeyleri (ppm)

Zaman	Serum	Karaciğer	Böbrek	Kas
4. saat	$0.95 \pm 0.07$	$1.2 \pm 0.04$	$0.9 \pm 0.07$	$0.47 \pm 0.02$
8. saat	$1.25 \pm 0.17$	$1.55 \pm 0.21$	$1.42 \pm 0.12$	$0.95 \pm 0.06$
1.gün	$2.17 \pm 0.08$	$2.95 \pm 0.13$	$3.67 \pm 0.14$	$1.62 \pm 0.19$
2.gün	$3.17 \pm 0.12$	$4.95 \pm 0.13$	$5.37 \pm 0.3$	$2.2 \pm 0.1$
3.gün	$3.12 \pm 0.09$	$5.2 \pm 0.13$	$6.2 \pm 0.4$	$3.17 \pm 3.35$
4.gün	$4.07 \pm 0.09$	$5.65 \pm 0.25$	$6.6 \pm 0.5$	$3.67 \pm 0.23$
5.gün	$4.02 \pm 0.12$	$4.57 \pm 0.29$	$6.63 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.3$
6.gün	$4.72 \pm 0.2$	$5.75 \pm 0.33$	$8.4 \pm 0.2$	$4.2 \pm 0.18$
7.gün	$4.67 \pm 0.23$	$6.45 \pm 0.3$	$9.3 \pm 0.17$	$4.4 \pm 0.19$
8.gün	$4.57 \pm 0.3$	$6 \pm 0.15$	$9.3 \pm 0.26$	$4.7 \pm 0.17$
9.gün	$4.25 \pm 0.18$	$6.4 \pm 0.18$	$9.2 \pm 0.2$	$4.75 \pm 0.2$
10.gün	$4.82 \pm 0.24$	$6.22 \pm 0.18$	$9.6 \pm 0.2$	$4.9 \pm 0.3$
11.gün	$3.02 \pm 0.3$	$6.48 \pm 0.21$	$9.8 \pm 0.4$	$4.95 \pm 0.27$
12.gün	$0.2 \pm 0.01$	$4.24 \pm 0.2$	$9.85 \pm 0.32$	$4 \pm 0.17$
13.gün		$2.4 \pm 0.07$	$4.6 \pm 0.24$	$3.1 \pm 0.34$
14.gün		$0.6 \pm 0.02$	$1.7 \pm 0.35$	$2.7 \pm 0.13$
15.gün			$0.7 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.21$
20.gün				$0.8 \pm 0.04$
25.gün				$0.2 \pm 0.01$



Şekil 1. Alabalıklarda enrofloksasin'in serum ve doku konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Kültür balıkçılığında yeni antibiyotiklerin kullanımı ile ilgili araştırmalar sırasında enrofloksasin birçok antibiyotik ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiş ve en güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip bileşik olduğu belirlenmiştir (6,11). Çeşitli mikroorganizma türleri ile gerçekleştirilen deneysel enfeksiyonlar ve saha çalışmalarından elde edilen bulgulara dayanarak enrofloksasinin 10 mg/kg dozda 7-10 gün süreyle uygulanmasının en iyi sağaltım modeli olduğu kabul edilmiştir. *Vibrio anguillarum* enfeksiyonlarına karşı 5, 10 ve 100 mg/kg dozlarda 7 gün süresince yemlerle verilmesi infekte edilen kontrol grubuna göre mortalite oranında önemli düzeyde azalmaya neden olmuş ve dozlar arasında istatistik yönden belirgin bir fark görülmemesine karşın en yüksek etki 10 mg/kg ile saptanmıştır (6). Benzer şekilde *Aeromonas salmonicida* ile infekte edilen kontrol grubundaki kümülatif ölüm oranı % 18.3 iken 10 mg/kg dozun 10 gün süreyle uygulanmasıyla bu oranın % 4.3'e düştüğü bildirilmiştir (2). Araştırmamızda bu sağaltım modeli esas alınarak dokulardaki rezidülerin zamana göre dağılımı incelendiğinde ilaç uygulanmasının kesilmesinden 1-2 gün sonra karaciğer, böbrek ve kaslarda ilaç konsantrasyonlarının en yüksek değerlere ulaştığı gözlemlendi. Ayrıca kas dokusundaki ilaç rezidülerinin diğer dokulara göre daha uzun süre varlığını sürdürdüğü, böbreklerde ise daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu saptandı. Tüm bu bulgular, ilacın bağ dokuya ve yağ dokudan zengin yapılara yeniden dağılımının göstergesi olarak değerlendirilebilir. Yapılan bir araştırmada enrofloksasin 5 mg/kg dozda verilmesinden 6-8 saat sonra elde edilen serum konsantrasyonlarının 24-36 saat sonraki düzeylere göre önemli farklılık göstermemesinin nedeni ilacın yeniden entero-hepatik dolanımına geçmesi şeklinde açıklanmıştır (10). Somon balıkları ile yapılan bir araştırmada enrofloksasin 10 mg/kg dozda 10 gün süresince yemlerle verilmiş ve ilacın kesilmesinden 30 gün sonra rezidü düzeyleri kas ve böbrek için sırasıyla 110 ve 6 ppb, karaciğerde ise 1 ppb'den daha düşük bulunmuştur. İnsan gıdası olarak tüketilen kas dokusunda 90 gün sonra bile rezidülerin 3 ppb olduğu saptanmıştır (13). Alabalıklarda enrofloksasin uygulamasını izleyen dönemin sonunda (15.gün) rezidü dağılımını incelediğimizde karaciğer ve böbreklerdeki enrofloksasin düzeylerinin saptama limitlerinin altına düştüğü ve yapılan araştırmalara (3,13) paralel olarak eliminasyonun diğer dokulara oranla karaciğerden daha hızlı gerçekleştiği bulundu. Buna karşın 15.günde kaslarda 0.2 ppm düzeyinde rezidü saptandı. Araştırmamızda alabalıklarda enrofloksasin rezidülerinin saptanma süresinin somon balıklarından elde edilen değerlere göre daha kısa olduğu ve bu süre içindeki ortalama rezidü düzeylerinin ise daha düşük bulunduğu belirlendi. Buna karşı bulgularımız, alabalıklar ile yapılan diğer araştırmalara benzerlikler gösterdi. Bu durum analiz yönteminin yanı sıra balık türlerindeki metabolizma farklılığına bağlı olabilir. Somon ve alabalıklarda enrofloksasin farmakokinetiğinin karşılaştırılmalı bulguları somon balıklarındaki eliminasyon hızının alabalıklara göre 10-28 kez daha yavaş olduğunu göstermiştir (13).

Araştırmamızda enrofloksasinin 10 mg/kg dozda verilmesiyle saptanabilen konsantrasyonların tümü birçok bakteri türü için kabul edilen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin (14) oldukça üstündedir. Bir ilacın etkin-

liği için, infekte dokudaki konsantrasyonunun patojen bakterileri öldüren veya gelişmelerini inhibe eden değerleri geçmesi koşulu göz önüne alındığında bu dozun gereğinden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Elde edilen bulgulara dayanarak, kültür balıkçılığında yaygın olarak kullanılmaya başlanan enrofloksasinin, sağaltım amacıyla uygulanması sonucu sakıncalı sayılabilecek boyutlarda dokulara geçtiği söylenebilir. Etinden yararlanılan tüm türler için tolerans düzeyinin 30 ppb kadar düşük bir değere sahip olması (9), kaslardaki rezidülerin ise uzun süre ve yüksek konsantrasyonlarda varlığını sürdürmesi gibi faktörler bu bileşiğin bilinçli kullanımını gerektirir. Herhangi bir sağlık sakıncası yaratmaksızın kullanılabilmesi için etkin ölenmelerin alınmasının zorunlu olacağı düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Ball P (1989) : Adverse reactions and interactions of fluoroquinolones. Clin. Investig. Med., 12, 1, 28-34.
2. Bowser PR, Babish JG (1991): Enrofloxacin in salmonids. Vet. Hum. Toxicol., 33 (supp. 1), 46-48.
3. Bowser PR, House M (1990): *In vitro* sensitivity of some fish pathogens to the quinolones nalidixic acid and oxolinic acid and the fluoroquinolone enrofloxacin. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 10, 48-49.
4. Bowser PR, Schachte JH, Wooster GA, Babish JG (1990): Experimental treatment of *Aeromonas salmonicida* infections with enrofloxacin and oxolinic acid: field trials. J. Aquat. Anim. Health, 2, 198-203.
5. Bowser PR, Wooster GA, St Leger J, Babish JG (1992): Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Vet. Pharmacol. Ther., 15, 62-71.s
6. Dalsgaard I, Bjerregaard J (1991): Enrofloxacin as an antibiotic in fish. Acta Vet. Scand., Suppl.87, 300-302.
7. Heo GJ, Seo JJ (1996): Efficacy of ciprofloxacin against selected fish pathogens in cultured fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 17,(1), 8-12.
8. Hooper DC, Walfson JS (1985) : The fluoroquinolones : Pharmacology, clinical uses and toxicities in humans. Antimicrob. Agents Chemother., 28, 5, 716-721.
9. Kaya S (1997): Besinlerdeki ilaç kalıntıları ve denetimi. Añnmuştur: Veteriner Uygulamalı Farmakoloji, edt. Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A. 605-622. 2.Cilt, 1.Baskı, Medisan Yayınevi (Seri No:28), Ankara, Türkiye.
10. Lewbart G, Vaden S, Deen J, Manaugh C, Whitt D, Doi A, Smith T, Flammer K (1997): Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration. J. Vet. Pharmacol. Therap., 20, 124-128
11. Martinsen B, Oppegaard H, Wichstrom R & Myhr E (1992): Temperature-dependent *in vitro* antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. Antimicrob. Agents and Chemother., 36, 8, 1738 - 1743.
12. Scheer M (1987) : Concentrations of active ingredient in the serum and in tissues after oral and parenteral administration of Baytril. Vet. Med. Rev., 59, 2, 104-118.
13. Stoffregen DA, Chako AJ, Backman S, Babish JG (1993): Successful therapy of furunculosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using the fluoroquinolone antimicrobial agent enrofloxacin. J. Fish Dis., 16, 219-228.

**14.Stoffregen DA, Wooster GA, Bustos PS, Bowser PR, Babish JG (1997):** Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 20, 111-123.

**15.Sundlof S, Ringer N (1991):** Focus on metabolism studies and data requirements for aquaculture species

*Vet. Hum. Toxicol.*, 33, suppl.1, 71-74.

**16.Şanlı Y (1999):** Veteriner Klinik Farmakoloji ve İlaçla Sağaltım İlkeleri. Medisan Yayınevi. Ankara.

**17.Wilson JC, MacMillan JR (1989):** Evaluation of two aryl-fluoroquinolones against bacterial pathogens of Channel Catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, 1, 222-226.