

TAVŞAN DOKULARINDA KLORAMFENİKOL KALINTILARI
ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Ferda Akar¹, Hidayet Yavuz¹, B. Cem Liman², Abdullah Doğan²

Ayhan Filazi¹

Studies on the residues of chloramphenicol in rabbit tissues.

Summary: *In this study, chloramphenicol at 20 mg / kg body weight was administered i.m. to two month old rabbits. The rabbits were divided into four groups. The rabbits of the first group were euthanatized 6 hours after the administration of chloramphenicol. The rabbits of the second group were euthanatized 24 hours after the administration of chloramphenicol. The rabbits of the third group were euthanatized 48 hours after the administration of chloramphenicol. The fourth group of rabbits acted as controls.*

Muscle, kidney, liver, lung and skin tissues collected immediately after euthanasia and their chloramphenicol concentrations were determined by TLC-Bioautography.

According to the type of tissue the average levels of chloramphenicol residues as ppm were as follows: 0.16 in skin, 0.28 in muscle, 0.30 in lung, 0.45 in liver, 0.63 in kidney, 6 hours after chloramphenicol was administered: 0 in skin, 0.09 in muscle, 0.10 in lung, 0.12 in liver, 0.21 in kidney, 24 hours after chloramphenicol was administered; 0 in skin, 0.006 in muscle, 0.003 in lung, 0.023 in liver and 0.07 in kidney, 48 hours after chloramphenicol was administered.

On the basis of the results of this study it can be concluded that tissue concentrations of chloramphenicol decreased as the period of time after which the drug was given.

1 Araş. Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Ankara.

2 Araş. Gör., A.Ü. Kğrs Veteriner Fakültesi, Kars.

Özet: *Bu çalışmada, tavşanlarda parenteral yolla uygulanan kloramfenikolün doku kalıntı düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için Yeni Zellanda ırkı 2 aylık 12 adet erkek tavşanlar kullanılmıştır.*

Tavşanlar her grupta 3'er adet olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Gruplardan 3'üne i.m. yolla tek doz halinde 20 mg / kg miktarında kloramfenikol uygulanmıştır. Kloramfenikol uygulanan 1'inci grup tavşanlar 6 saat sonra, 2'inci grup tavşanlar 24 saat sonra, 3'üncü grup tavşanlar ise 48 saat sonra eter ile ötanezi edilmiştir.

Tavşanlardan alınan deri, kas, akciğer, karaciğer ve böbreklerdeki kloramfenikol kalıntı düzeyleri TLC-Biyootografi yöntemi ile tayin edilmiştir. Dokuların yapılan analizlerinde tesbit edilen kalıntı yoğunlukları ortalama ppm olarak şöyledir: 6 saat sonra deride 0.16, kas dokusunda 0.28, akciğer dokusunda 0.30, karaciğer dokusunda 0.45, ve böbrek dokusunda 0.63; 24 saat sonra deri dokusunda 0, kas dokusunda 0.09, akciğer dokusunda 0.10, karaciğer dokusunda 0.12 ve böbrek dokusunda 0.21; 48 saat sonra ise deri dokusunda 0, kas dokusunda 0.006, akciğer dokusunda 0.003, karaciğer dokusunda 0.023 ve böbrek dokusunda ise 0.07 olarak tesbit edilmiştir.

Sonuç olarak dokulardaki kloramfenikol kalıntı yoğunlukları zamanla azalma göstermiştir.

Giriş

Kloramfenikol 1947 yılında Burkholder tarafından streptomyces venezuelae kültürlerinden elde edilmiştir. Bu ilaç yapı tayini ve kimyasal sentezinden sonra 1948-1949 yıllarında insan ve hayvan hastalıkları tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (4, 7, 11, 14, 24). Kloramfenikol nitrobenzen ve diklorasetik asit türevi olan, D- (—) -threo -2-, dichloroacetamide -1- p- nitrophenyl-1:3- propanediol kimyasal yapılı bir antibiyotiktir (7, 10, 16).

Kloramfenikol geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Salmonella typhosa Hemophilus influenza, Bacterioides fragilis, Neisseria meningitidis, N. gonorrhoeae, Streptococcus pneumonia, Staphylococcus aureus, S. epidermis, Brusellalar, Pasteurella aeruginosa, Shigella paradysenteria, E. coli, Aerobacter aerogenes, Streptococcus pyogenes, Pasteurella tularenses, Proteus vulgaris, Bacillus anthracis, Cyanobac-

terium pyogenes ve Klebsiella pneumonia gibi patojenlerin neden olduğu hastalıkların sağıtımında kullanılmaktadır (3, 5, 14, 19, 24, 26, 27).

Kloramfenikol genellikle bakteriyostatik etki gösterir. Antibakteriel etkisini, bakterilerin ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle yapar (5, 27).

Klorafenikolün tedavide kullanılan 2 tip esteri vardır. Palmitat esteri suda çözünmez ve ağız yoluyla kullanılır. Barsak kanalında lipaz enziminin etkisi altında palmitat ayrılır ve serbest kalan kloramfenikol absorbe edilir. Süksinik asit esteri ise daha fazla çözünür ve bu nedenle injeksiyonluk kloramfenikol solusyonunun hazırlanmasında kullanılır (4, 10, 11, 16).

Kloramfenikol parenteral veya (ruminantlar hariç) ağız yolu ile uygulamadan sonra iyi bir şekilde absorbe edilir. Ağız yoluyla verildiğinde maksimum kan yoğunluğuna 1.5-2 saatte ulaşmaktadır. İntra muskuler uygulanmasından sonra terapötik plazma konsantrasyonlarına (en az 5 mikrogram / ml) 30 dakika içinde erişir. Etkili kan yoğunluğu 5-10 mikrogram / ml arasındadır. Kan proteinlerine % 40-60 oranında bağlanmaktadır. Sığırlarda kloramfenikolün yarı ömrü ağız yoluyla uygulandığında 7 saat, i.v. yolla uygulandığında ise 3 saattir. Kloramfenikol uygulamayı takiben serebrospinal sıvı dahil vücut sıvılarına ve tüm vücut dokularına dağılır. İlaç sistemik uygulamadan sonra göz içi sıvılarda nüfuz eder ve lokal uygulamadan sonra korneaya diffüze olur. Kloramfenikolün % 90'ı karaciğerde glüküronik asitle konjügasyon suretiyle biyotransformasyona uğrar. Vücuda giren kloramfenikolün % 90'ı böbrekler yoluyla atılır. İdrarda bulunan kloramfenikolün ancak % 10 kadarı değişmemiş etkin ilaç halindedir. İlacın çok az bir kısmı safra ve feçes içine salgılanır, (3, 6, 8, 9, 10, 16, 17, 23, 24).

Uzun süre ve yüksek dozlarda kloramfenikol uygulanan insan ve hayvanlarda ilacın direkt toksik etkisine bağlı olarak kemik iliğinde reverzibl nitelikte depresyon şekillenir; sonuçta anemi, retikülosit sayısında azalma, serum demir düzeyinde artma, lökopeni ve trombositopeni ortaya çıkar. Kloramfenikole bağlı kemik iliği depresyonunun ikinci şekli, doza ve tedavi süresine bağımlı olmayan aplastik tipteki anemidir. Bu nadir görülen, fakat irreverzibl nitelikte olması nedeniyle ölüme sonuçlanabilen ciddi bir komplikasyondur. Bugün için idiyosenkrazi tipinde bir reaksiyon olduğu kabul edilmektedir; genetik predispozisyona bağlı olması muhtemeldir (3, 13, 15, 16, 20, 26).

Diğer yan etkileri ise şunlardır: Gastrointestinal bozukluklar, allerjik reaksiyonlar, gri sendrom, herxheimer reaksiyonu, bağışıklık oluşumunu engelleme, ve nörotoksik etkidir (7, 10, 14, 16).

Kloramfenikolle tedavi edilen hayvanlarda ilaç kalıntıları ete, süte ve yumurtaya geçebilmektedir. Yenilebilir dokulardaki kloramfenikol kalıntıları duyarlı insanlarda aplastik oluşturması bakımından önemlidir (7, 8, 13, 19).

Gerek sağıtım amacıyla ve gerekse katkı maddesi olarak kullanılan kloramfenikolün ihmal edilmeyecek ölçülerde hayvansal besinlere geçtiği ve dolayısıyla insan sağlığı açısından bakteriyel rezistans ve kronik toksisite riski taşıdığı ortaya konulmuştur (19).

Avrupa Ekonomik Topluluğu etlerde kloramfenikolün tolerans düzeyinin 10 mikrogram / kg. düzeyinde olmasını (1) FAO / WHO ise insan gıdalarında kloramfenikol kalıntılarının bulunmamasını öngörmektedir (7).

Materyal ve Metot

A. Materyal: Bu çalışmada 12 adet Yeni Zelanda ırkı iki aylık erkek tavşanlar kullanılmıştır. Tavşanlar her grupta 3'er adet olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Gruplardan 3'üne I.M. yolla tek doz halinde 20 mg / kg kloramfenikol uygulanmıştır. Kloramfenikol uygulanan tavşanlar sırası ile 6, 24, 48 saat sonra eter ile ötenazi edilmiştir. Bu tavşanlardan alınan Deri, kas, akciğer, karaciğer ve böbrek dokuları materyal olarak kullanılmıştır. Kloramfenikol uygulanmayan Dördüncü grup kontrol olarak kullanılmıştır.

Araç ve Gereçler:

1. Santrifüj tüpleri (50 ml.)
2. TLC plakaları, 20x20 silikajel G (Merck)
3. Biyoplakalar. Sterilize edilmiş cam plakalar (245x245 mm)
4. Solventler. Metanol, Kloroform, Aseton, Gliserin. (Merck)
5. TLC devalopment solvent sistemi. Metanol, Kloroform, Aseton, Gliserin (30+49+20+1).
6. Deney bakteri suşu. Bacillus subtilis ATCC 6633 Difco spor solüsyonları.

7. Standard plate count agar. (Oxoid)

8. Antibiyotik standardı. Kloramfenikol (Sigma)

9. Stok solüsyonu: 100 mg. kloramfenikol 100 ml. metanolda çözdürülür. Buzdolabında saklanır. Haftalık hazırlanır.

10 Çalışma solusyonu: Stok solusyonunun metanol ile 10 kat sulandırılmasıyla elde edilir. Günlük hazırlanır.

B. Metod: Neidert, E. ve ark. (21) tarafından bildirilen TLC-Biyotografik metod ile dokularda kloramfenikol kalıntı analizi yapılmıştır. Bunun için 10 gr. doku alınıp küçük parçalara ayırdıktan sonra 50 ml. lik santrifüj tüpüne konur. Üzerine 10 ml. metanol ilave edilir. Mikser de orta hızda 30 saniye karıştırılır. Üç kez 2 ml. metanol ile santrifüj tüpü yıkanır. 700 devirde 10 dakika santrifüj edilir. Üst kısım 1000 ml. lik balona aktarılır. Tüpün tabanında kalan tortu iki kez 10 ml. metanolle yıkanır ve diğer metanol ekstraktının bulunduğu balona aktarılır. Balona 200 mg. NaCl konur ve 50 C'de 3-4 ml. kalıncaya kadar rotavaporda uçurulur. Kalan kısım 125 ml. 'lik ayırma hunisine aktarılır. İki kez 25 ml. kloroformla ekstekte edilir. Kloroform fazı tamamen kuruyuncaya kadar uçurulur 0.5 ml. metanolde çözdürülerek 5-10-20 mikrolitre olarak plakaya uygulanıp, plaka devalopma tan-kında devalope edildikten sonra oda ısısında bir saat bekletilerek kurutulur.

Biyootografi: Biyoplakalar otoklavda (120 C 1 Atm. basınç altında 30 dk.) sterilize edilir.

Standard Plate Count Agar'dan 23.5 g. tartılır ve üzerine 1 lt. distile su ilave edilir. 100 C'deki su banyosunda tamamen eriyinceye kadar tutulur. Daha sonra 100 ml. balonlara bölünür. 120 C, 1 Atm. basınç altında 30 dakika sterilize edilir ve 45-50 C'ye kadar soğutulur. Üzerine 400 ml. Bassillus subtilis ATCC 6633 spor solüsyonundan ilave edilir.

Agar'dan 100 ml. olacak şekilde biyoplakaya dökülür. 20 dakika katılaşması için beklendikten sonra TLC plaka biyoplaka yüzeyine kapatılır. 20 dakika sonra TLC plakası kaldırılır ve atılır. Biyoplakalar 37 C'de bir gece bekletilir. Ertesi gün oluşan zonlar standartların oluşturduğu zonlar ile karşılaştırılır.

Bulgular

Yapılan bu deneysel çalışmada 20 mg/kg. dozunda im. yolla kloramfenikol verilen tavşanlardan altı, yirmidört ve kırksekiz saat sonra alınan deri, kas, akciğer, karaciğer ve böbrek dokularındaki kloramfenikol kalıntı düzeyleri TLC-Biyootografik yöntem ile tesbit edilmiş olup kalıntı düzeyleri tablo 1'de gösterilmiştir. Ayrıca zaman kalıntı düzeyleri arasındaki ilişki de bir grafikte aşağıda verilmiştir.

Tablo 1. Kloramfenikolün dokularda tesbit edilen kalıntı düzeyler,

(ppm)	Enjeksiyondan sonra 6 saat				
Tavşan No	Deri	Kas	Akciğer	Karaciğer	Böbrek
1	0.12	0.22	0.31	0.42	0.62
2	0.15	0.32	0.26	0.52	0.75
3	0.22	0.32	0.35	0.42	0.52
Ortalama	0.16	0.28	0.30	0.45	0.63
	Enjeksiyondan 24 saat sonra				
1	0	0.06	0.10	0.11	0.24
2	0	0.11	0.06	0.11	0.20
3	0	0.11	0.16	0.16	0.20
Ortalama	0	0.09	0.10	0.12	0.21
	Enjeksiyondan 48 saat sonra				
1	0	0	0.011	0.025	0.060
2	0	0.007	0	0.020	0.080
3	0	0.011	0	0.025	0.070
Ortalama	0	0.006	0.003	0.023	0.070

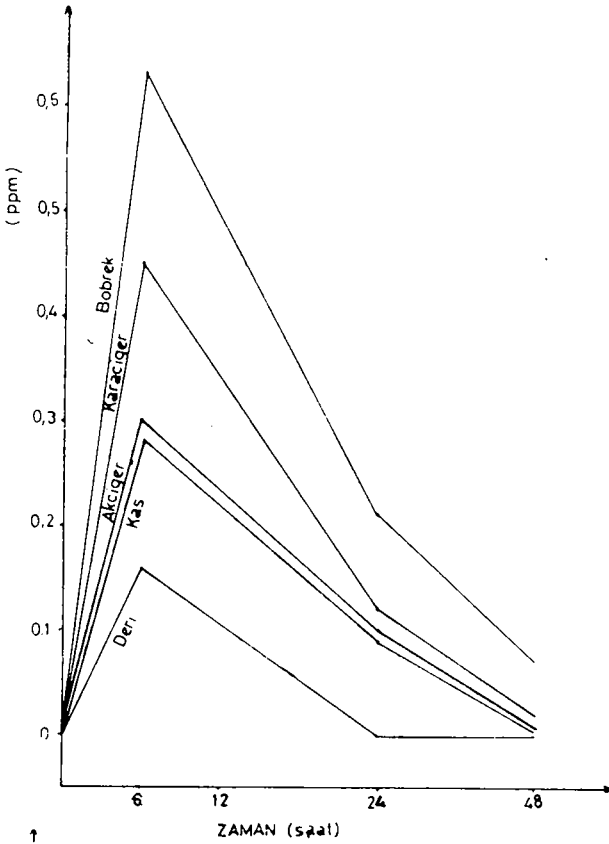
Tabloda görüldüğü üzere her periyoddaki kloramfenikol kalıntı düzeyleri en yüksek olarak böbrek dokusunda saptanmış bu azalan konsantrasyonlarda şu dokular izlenmiştir; karaciğer, akciğer, kas ve deri dokusu.

Grafikte de görüldüğü üzere kloramfenikol kalıntı düzeyleri zamana bağlı olarak bir azalma göstermektedir.

Tartışma ve Sonuç

Kloramfenikol geniş spektrumlu bir antibiyotik özelliğine sahip olduğundan tavukçuluk sektörü dahil bütün hayvancılık alanında mikrobiyel hastalıkların koruyucu ve iyileştirici sağtımlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Gerek tedavi gerekse koruyucu amaçla kullanılan kloramfenikolün hayvanların çeşitli dokularına geçme özelliğine sahiptir. Dokulara



↑
0005 Grafik 1: Kloramfenikol doku kalıntı yoğunluklarının zamana göre dağılımı

geçme özelliği nedeniyle böyle hayvansal ürünleri tüketen insanlarda bazı risklerle karşılaşılabilir. Kloramfenikole duyarlı insanlarda idiosinkrazi olgusuna göre dönüşümsüz aplastik anemi tehlikesi riski taşımaktadır. Bu amaçla değişik ülkelerde çeşitli araştırmacılar tarafından kloramfenikol uygulanmış hayvanların çeşitli dokularında kalıntı düzeylerinin saptanmasına ilişkin çalışmalar yapılmıştır (1, 7, 8, 9, 13, 15, 17, 21, 22).

Amerika Birleşik Devletlerinde besi hayvanlarında kloramfenikolün kullanılması yasal olmadığı halde, kloramfenikol kalıntıları et ürünlerinde tespit edilmiştir (22). Sığırlarda kloramfenikol kalıntıları 1981-1983 yılları arasında % 0.3 ile % 0.7 arasında ve konsantrasyon-

ları ise 0.02 ppm ile 12.671 ppm arasında tespit edilmiştir (15). Epstein tarafından yapılan bir çalışmada buzağılara im. yolla tatbik edilen kloramfenikolün kas dokusunda ve enejksiyon bölgelerindeki kalıntı düzeyleri zamana bağlı olarak azalma göstermiştir (8). Yine yapılan bir çalışmada içme sularına 40 ppm düzeyinde kloramfenikol katılmış olan su, 7 haftalık broilerlere 5 gün süreyle içirilmiştir. Bu süre sonunda yapılan kalıntı analizlerinde kanatlıların kas, karaciğer, deri ve yağlarında 0.2 ppm düzeyinde, böbrekte ise 0.6 ppm düzeyinde kloramfenikol kalıntısı tesbit edilmiştir. İçme sularına antibiyotik katılımı durdurulduktan ortalama 8 saat sonra vücut yağı ve deride antibiyotik varlığı saptanmasına karşın aynı süre kassel kesimlerde 48 saat olarak ölçülmüştür. Antibiyotik uygulaması durdurulduktan 72 saat sonra da böbreklerde 0.3 ppm dolayında kloramfenikol bulunmuştur (14).

Troldenier, H. ve arkadaşları tarafından (25) yapılan deneysel çalışmada domuzlara 20-70 mg / Kg. dozunda bir kez kloramfenikol uygulanmıştır. Uygulamayı takiben bir saat sonra kesilen domuzların kas, akciğer, kalp ve böbre dokularında 3 mikrogram / ml. yoğunluğunda kloramfenikol tayin edilmiştir. Yine Haagsma, N. ve arkadaşları (12) tarafından yapılan deneysel bir çalışmada 50 mg / Kg. dozunda im. yolla kloramfenikol uyuulanmasını takiben yağlı ve yağsız et ile yağ dokuda yapılan kalıntı analizlerinde sırasıyla 212-272 mikrogram kg., 166-185 mikrogram / kg. ve 27-64 mikrogram / kg. kloramfenikol kalıntısı tesbit edilmiştir. Yapılan bu çalışmaya göre kloramfenikol kalıntı düzeyleri dokularda yağ oranı arttıkça azalma vöstermektedir. Korkoeala, A. tarafından (18) yapılan bir araştırmada da im. yolla tatbik edilen kloramfenikolün uygulamayı takiben ilk saatlerde kloramfenikol kalıntı düzeylerinin yüksek olduğunu tesbit etmiştir.

Sonuç olarak, deneysel olarak yapılan bu çalışmada kloramfenikol kalıntı düzeyleri zamana bağlı olarak bir azalma göstermektedir. Yukarıdaki literatür verileri de alınan sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Kaynaklar

1. Aerts R.M.L., Keukens, H.J. and Werdmuller, G.A. (1989). *Liquid chromatographic determination of chloramphenicol residues in meat: Interlaboratory study*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 22: 570-576.
2. Bauer, A.W., Kirby, M.M.V., Sherris, J.C. and Turck, M. (1966). *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Registry of Medical Rechnologist. 36 (3): 493-496.

3. **Boven, J.M.** (1986). *Chloramphenicol analogs*. Clinical Pharmacology Note. 38: 10-14.
4. **Brander, G.C., Pugh, D.M., Bywater, R.J.** (1982). *Veterinary Applied Pharmacology Therapeutics*. 4 th. ed. Bailliere Tindall. London.
5. **Crowford, L.M., Boven, J.M.** (1977). *Spectra of antibacterial agents*. Georgia Veterinary Medical Association. 29 (2): 11-14.
6. **Dökmeçi, İ.** (1979). *Farmakoloji*. D.Ü. Tıp Fak. Yay. s. 133-136.
7. **Edward, H.A.** (1985). *Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues from food-producing animals*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68: 990-999.
8. **Epstein, R.L., Aschworth, R.B., Simpson, R.M.** (1986). *Chloramphenicol concentration in calf muscle tissue*. Am. J. Vet. Res. 47 (9): 2075-2077.
9. **FAO Food and nutrition paper.** (1988). *Residues of some veterinary drug in animals and foods*. Monographs prepared by the thirty second meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Rome, 15-23 June 1987. Food and Agriculture Organisation of the United Nations Rome, 1988, pp. 1-6.
10. **Forth, W., Henschler, D., Rummel, W.** (1987). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toksikologie*. 5. Auflage. Mennheim. s. 633-637.
11. **Gilman, A.G., Goodman, L.S. and Gilman, A.** (1980). *Goodman and Gilman's-The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 6 th ed. Mac Millan Publishing Co., Inc New York.
12. **Haagsma, N., Schreuder, C., Rensen, R.Z.A.** (1986). *Rapid-sample preparation method for the determination of chloramphenicol in swine muscle by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography. 363 (2T): 353-359.
13. **Heitzman, R.D.** (1986). *Analytical methods for residues of veterinary drugs*. Drug Residues in Animals. Ed. by Andre G. Rico Academic Press. Inc. London. pp. 205-217.
14. **Huber, W.G.** (1982). *Aminoglycosides, macrolides, lincosamides, polymyxins, chloramphenicol and other antibacterial drugs*. In Both, N. H. and McDonald, L.E. 5 th. ed. The Iowa State University press/ Ames. pp. 748-771.
15. **Huber, W.G.** (1986). *Allergenicity of antibacterial drug residues*. In Rico, A.G. ed. Drug Residues in Animals. Academic Press Inc. London. pp. 33-49.
16. **Kayaalp, S.O.** (1987). *Tıbbi Farmakoloji*. Cilt 1, 4. baskı, Ankara.
17. **Knifton, A.** (1982). *Pharmacokinetics of antibacterials in calves*. The Veterinary Record. 11: 49-52.
18. **Korkeala, A., Maki-Petays, O.** (1984). *Detection of chloramphenicol residues in pigs with different agar diffusion methods*. Acta Veterinaria Scandinavica. 25 (3): 352-364.
19. **Lacey, R.W.** (1984). *Does the use of chloramphenicol in animals jeopardise the treatment of human infections?* The Veterinary Record. 114: 6-8.
20. **Moursi, S.A.H., Atef, M. and AL-Khayyat, A.A.** (1979). *Hepatotoxicity of chloramphenicol in normal goats by the assay of serum enzyme activity*. Zbl. Vet. Med. A. 26: 715-720.

21. Niedert, E., Saschenbrecker, P.W. and Tittiger, F. (1987). *Thin Layer Chromatographic / Bioautographic method for identification of antibiotic residues in animal tissues*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70 (2): 197-200.
22. Settepani, J.A. (1984). *The hazard of using chloramphenicol in food animals*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 184: 930-931.
23. Sissodia, C.S. (1908). *Pharmacotherapeutics of chloramphenicol in veterinary medicine*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 176: 1069.
24. Şanlı, Y. (1988). *Veteriner Farmakoloji*. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları. No. 412. s. 131-140.
25. Trolldenier, H., Ratzinger, S. Bache, K., Atum, H. (1985). *Plazma and tissue concentrations of chloramphenicol in swine after injection*. Monatshefte für Veterinermedizin. 40 (5): 151-155.
26. West, B.C., DeVault, G.A., Clement, J.C. and Williams, D. (1988). *Aplastic anemia associated with parenteral chloramphenicol. Review of cases including the second case of possible increased risk with cimetidine*. Reviews of Infectious Diseases. 10: 1048-1051.
27. Wooley, R.E., Jones, M.S., Gilbert, J.P. and Shotts, E.B. (1983). *In vitro action of chloramphenicol of antimicrobial agents and EDTA-tromethazine on Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res. 44: 1154-1158.