

## TEDAVİ DOZLARINDA KLORAMFENİKOL UYGULANAN MASTİTİSLİ İNEKLERİN SÜTLERİNDE KLORAMFENİKOL DÜZEYLERİ VE ATILMA SÜRELERİNİN ARAŞTIRILMASI\*

Ahmet Acet<sup>1</sup> Ömer Demet<sup>2</sup> D. Ali Dinç<sup>3</sup> Bünyamin Traş<sup>4</sup> A. Levent Baş<sup>5</sup>

A study on the levels and withdrawal times of chloramphenicol from milk of mastitic cows medicated with chloramphenicol at therapeutic dose.

**Özet:** Bu çalışma tedavi dozlarında kas içi, meme içi ve kas içi +meme içi yolla kloramfenikol uygulanan mastitisi ineklerden belirli aralıklarla alınan süt örneklerinde kloramfenikol kalıntı düzeyleri ve sütle atılma sürelerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı.

Deneysel olarak yapılan bu çalışmada, herbiri ikişer adet İsviçre Esmeri inekten oluşan üç grup hayvan kullanıldı. Süt örnekleri, ilacın hayvanlara verilmesinden, itibaren 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 32 ve 46. saatlerde alındı. Grup I'de 10 mg / kg dozunda kloramfenikolün kas içi uygulamasından sonra alınan ve analiz edilen sütlerde ortalama ilaç yoğunluğu, birinci saatte 24.072 mg/L, 8. saatte 0.096 mg / L, Grup II'de her bir meme lobuna 2 g kloramfenikol uygulamasından sonra birinci saatte 488.720 mg/L, 24. saatte 0.019 mg/L ve Grup III'de ise 10 mg/kg kas içi ve meme içi 2 g dozunda kombine kloramfenikol uygulamasından sonra birinci saatte 784.05 mg/L, 32. saatte 0.038 mg/L düzeylerinde belirlendi. Grup I'de 8. saatte, Grup II'de 24. saat ve Grup III'de 32. saatten sonra alınan sütlerde ilaç kalıntısı bulunamadı. Belirlenen kloramfenikol değerlerinin seyri bir grafik ile gösterildi. Buna göre, kloramfenikolün sütle atılma düzeyleri ve süresinin, uygulama yolları ve dozlarına bağlı olarak değiştiği görüldü.

**Summary:** This study was conducted to determine chloramphenicol level and its clearance time from milk cow with mastitis, which were medicated with chloramphenicol at therapeutic doses.

In this experimental study, three groups that each has two Browns Swiss cows were used. Milk samples were collected and analysed in the last of 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 12., 24., 32., 46, hours after administration of drug. In Group I, after intramuscular enjection of 10 mg / kg chloramphenicol average drug levels were found as 24.072 mg/kg at first hour, 0.096 mg/kg at eight hour. These levels were 488.720 mg / kg at first 0.19 mg/ kg at twentyfourth hour in Group II after intramammary injection 2 g chloramphenicol and 784.05 mg/kg at first, 0.038 mg/kg at thirtysecond in Group III after administration of intramuscular 10 mg/kg intramammary 2 g chloramphenicol combination. No Drug residue was found in milk collected after 8 hour in Group I, 24 hour in Group II and 32 hour in Group III. The curve of chloramphenicol level was showed with a graphic against time period. As a result, chloramphenicol levels and discarding time were seen changing according to administration ways and doses.

### Giriş

Kloramfenikol gram pozitif ve gram negatif bakterilere, riketsiyalara ve pisittacosis lymphogranulom grubu mikroorganizmalara etkili geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Sığırlarda özellikle gram negatif mikroorganizmalardan ileri gelen enfeksiyonların sağıtımında etkindir. Ülkemizde ve bazı Avrupa ülkelerinde özellikle mastitis'in sağıtımında geniş çapta kullanıldığı halde, A B D'de süt sığırlarında ve eti insan tüketimine sunulacak hayvanlarda kullanımına mücade edilmemektedir (3, 16). Mastitis, süt inekçiliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Etkili bir sağıtım ancak, değişik yollardan antibiyotik uygulaması ile sağlanabilir. Özellikle antibiyotiklerin meme içi uygulaması sütün ilaç kalıntıları ile aşırı düzeyde kirlenmesine yol açar (10).

Akut mastitis olgularından izole edilen gram pozitif mikroorganizmaların % 95'inin, gram negatiflerin ise % 89.1'inin kloramfenikole duyarlı olduğu belirlenmiştir (4). Özellikle koliform mastitislerin perakut, akut veya subklinik şekilde ortaya çıktığı (14) ve kloramfenikol ile başarıyla sağıtılabildiği bildirilmektedir (12).

Kloramfenikolün gerek oral, gerekse parenteral uygulamaları sonucu vücudun sıvı ve dokusal kesimlerine hızla yayıldığı (1,13) ve çeşitli doku ve hayvansal ürünlerde kalıntı bıraktığı (2, 7, 11) belirlenmiştir Mastitis insidensinin bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de yüksek olması, bu nedenle de antibiyotiklerin kontrolsüz bir şekilde geliş güzel uygulanması hem süt teknolojisini olumsuz etkilemekte hemde insan sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir (15). Amerikan ilaç ve Gıda Örgütü (FDA) ve Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) et, süt, yumurta gibi hayvansal ürünlerde Kloramfenikol kalıntılarının bulunmaması gerektiğini bildirmektedirler. Hayvansal gıda üretiminde kullanılan kloramfenikolün yem katkı maddesi olarak da kullanılması yasaklanmıştır (3).

Yapılan araştırmalara göre kloramfenikol, veriliş yoluna bağlı olmaksızın süt (3, 13, 15, 16), yumurta (1, 3) ve dokulara (6,7) geçerek kalıntı oluşturmaktadır. Wal ve ark. (16), keçilere kas içi ve meme içi tedavi dozunda kloramfenikol uygulayarak, ilacın sütteki zamana göre yoğunlukları ve atılma sürelerinin tesbit edilmesine yönelik çalışmalarında; ilacın uygulamasından sonraki 32 saatlik süre içerisinde alınan sütlerde ilaç kalıntısının bulunduğu, 32. saatten sonra alınanlarda ise kalıntının bulunmadığı belirtilmektedirler.

Pastörizasyon ve kaynatma ile sütteki antibiyotik kalıntıları tümüyle bertaraf edilememektedir. Sütün 100 °C'ye kadar ısıtıl-

\* Bu çalışma S. Ü. araştırma Fonu'nun desteği ile yürütülmüştür.

1 Doç. Dr. İ.Ü. Tıp Fak. Farmakoloji Anabilim Dalı / Malatya

2 Doç. Dr. S.Ü. Vet. Fak. Farmakoloji Anabilim Dalı / Konya

3 Doç. Dr. S.Ü. Vet. Fak. Doğum ve Rep. Hast. Anabilim Dalı / Konya

4 Yrd. Doç. Dr. S.Ü. Vet. Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı / KONYA

5 Arş. Gör. S.Ü. Vet. Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı / KONYA

ması ile pensilinin % 50'si, Streptomisin % 66'sı, tetrasiklinin % 90'nı tahrip olduğu halde, kloramfenikolün bu ısıya dayanıklı olduğu bildirilmektedir (15).

Besin maddeleri ile birlikte alınan antibiyotiklerin bazı önemli sakıncaları vardır. Bu sakıncaların başlıcaları; hastalık etkeni mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç kazanmaları ve antibiyotiklere bağlı olarak oluşabilecek toksik etkiler şeklinde özetlenebilir (5, 7, 9). Bu kapsamda olmak üzere insanda salmonella enfeksiyonlarına karşı etkin bir şekilde kullanılan kloramfenikole salmonella etkenlerinin direnç kazanması tedavi açısından son derece önemlidir. Öte yandan kloramfenikolün düşük düzeylerde uzun süre alınmasının insanda aplastik anemi, lökopeni ve granülositopeni gibi ciddi rahatsızlıklara neden olduğu da bilinmektedir (3, 15).

Bu çalışma ile, tedavi dozlarında kas içi, meme içi ve kas içi + meme içi yolla kloramfenikol uygulanan mastitisli ineklerden belirli aralıklarla alınan süt örneklerinde, kloramfenikol ilaç kalıntı düzeyleri ve sütle atılma sürelerinin belirlenmesi amaçlandı.

#### Materyal ve Metot

Hayvan materyali olarak deneysel çalışmalarda, Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsüne ait 5 yaşlarında üçüncü laktasyon dönemine girmiş, bir ya da birden fazla meme lobunda klinik veya subklinik mastitis bulunan 6 adet İsviçre Esmeri inek kullanıldı. Mastitis olgusu, klinik bulgular ve CMT ( California Mastitis Test) sonuçlarına göre belirlendi. Buna göre mastitis derecesi negatif-, subklinik (+,++) ve klinik (+++) şeklinde gösterildi.

#### Hayvanlara İlaç Uygulaması ve Süt Örneklerinin Alınması

Araştırma, her grupta ikişer hayvan olmak üzere üç grupta yürütüldü. Kloramfenikol (Leukomisin, Bayer) Grup I, II ve III'deki hayvanlara sırasıyla kas içi (10 mg/kg), herbir meme lobuna meme içi (2g) ve kas içi + meme içi (10 mg/kg+2g) şeklinde uygulandı. Hayvan grupları, klinik bulgular ve CMT sonuçlarına göre mastitis dereceleri, ilacın hayvanlara verilmiş yolu ve dozları tablo 1'de görülmektedir.

Kloramfenikolün ineklere verilmesinden itibaren 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 32 ve 46. saatlerde alınan süt örneklerinde kloramfenikol kalıntı düzeyleri araştırıldı. Hayvanlara ilaç uygulaması ve alınan sütlerde ilaç düzeylerinin araştırılması Wal ve ark. (16)'nın benzer amaçla uygulamış oldukları yöntemle yapıldı.

#### Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması

a. Solventler : Etilasetat (Merck), Asetonitril (Merck), İzooktan (Merck), Kloroform (Merck), Propilen glikol (Merck), Metanol (Merck)

b. Standart kloramfenikol çözeltileri.

Stok çözelti (250 ug/ml): 25 ml kloramfenikol (SIGMA) tartılarak 100 ml balon jode asetonitril ile çözündürülerek hazırlandı.

Çalışma çözeltileri (25, 2.5, 0.25 ug / ml): Stok çözeltiden mobil faz ile hazırlandı.

c. Kromatografi (HPLC) ve şartları

Likit Kromatografi (LC-6A Shimadzu), Dedektör (UV-VIS Spektrofometrik SPD,6AU., Kolon (C 18 CLC-ODS 15 cm X6mm), Yazıcı (C-R6A Chromatopac Shimadzu). Kolon akış

hızı 1.5 ml/ dk, Spekro dalga boyu 280 nm, Absorbans: 0.01 Yazıcı kağıt hızı: 10 mm/dk.

#### Süt Örneklerinin Eksetraksiyonu ve analizi

25 ml süt 250 ml'lik ayırma hunisine konarak üzerine 75 ml etilasetat ilave edildi. Karıştırıldıktan ve fazlar ayrıldıktan sonra etilasetat fazının yarısı ( 37.5 ml) alınarak evaporatörde kuruyuncaya kadar uçuruldu. Kalıntı 2X5 ml asetonitrilde çözülürerek 50 ml'lik ayırma hunisine aktarıldı. Ekstrakt 2X3 ml izooktan ile çalkalanarak yağlardan arındırıldı. Kalan asetonitri fazı kurumaya yakın yoğunlaştırıldı. Kalıntı 2X1 ml etilasetat ile ağız kapalı dibi konik bir tüpe alınarak, uçuruldu ve yeniden 0.2 ml kloroformda çözündürüldü. Üzerine 0.2 ml propilen glikol +su (50+50) ilave edilerek vorteks mikserde karıştırıldıktan sonra dinlenmeye bırakıldı. Üstte oluşan sulu -alkolik fazın 20 ul'sinin HPLC'ye enjeksiyonu ile analiz gerçekleştirildi.

#### Bulgular

Her biri ikişer hayvandan oluşan ve üç gruba ayrılan ineklere kloramfenikolün uygulanış yolları ve dozları tablo 1'de görülmektedir.

Grup I'de, kloramfenikol uygulamasından sonraki ilk saatte alınan sütlerde ilaç düzeyi 24.072 mg/L, 8. saatte ise 0.096 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu düzeyler Grup II'de ilk saatte 488.720 mg/L, 24. saatte 0.019 mg/L ve Grup III'de ise ilk saatte 784.05 mg/L, 32. saatte 0.038 mg/L'dir. Belirlenen kloramfenikol değerlerinin aritmetik ortalaması alınarak zaman göre kloramfenikol düzeylerinin seyri grafik 1'de gösterildi.

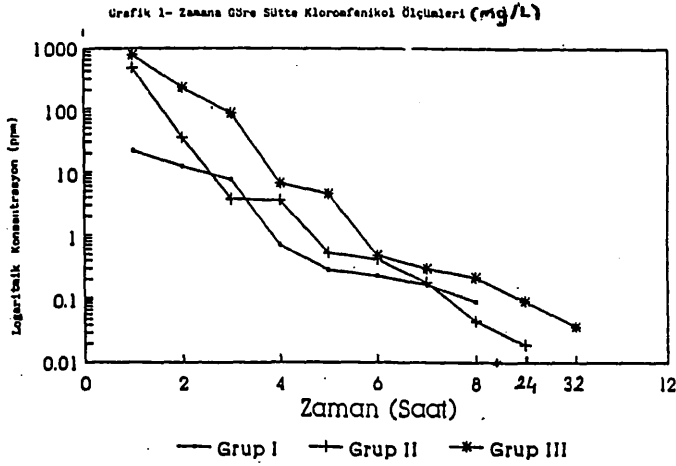
Grafik 1'de görüldüğü gibi kloramfenikol uygulanan hayvanlardan alınan sütlerin analizleri sonucunda ilacın verilmesinden itibaren; Grup I'de 8. saat, Grup II'de 24. saat ve Grup III'de 32 saatten sonraki alınan sütlerde ilaç kalıntısı tespit edilemedi. Buna göre kloramfenikolün sütle atılma süresinin uygulanış yolları ve dozlarına bağlı olarak değiştiği (Kas içi : 8, meme içi 24 : Kas içi + meme içi: 32 saat) belirlendi.

Kloramfenikolün farklı yoğunluklarda kontrol olarak kullanılan ve ilaç içermeyen sütlere katılması ile yapılan analizleri sonucu geriye kazanç yüzdesi % 86-93, analiz duyarlılığının ise 2 ug/L olduğu tesbit edildi.

Tablo 1 : Klinik ve CMT bulgularına göre mastitisin derecesi, verilen kloramfenikol dozu ve uygulama yolu

Hayvan Grupları	MASTITİSİN DERECESİ				Uygulama Yolu	Dozaj
	Sağ Ön	Sağ Arka	Sol Ön	Sol Arka		
GRUP I	Negatif	Negatif	* Subklinik CMT +	Subklinik CMT +	İM	10 mg/kg
	* Subklinik CMT +	Negatif	Negatif	Negatif	İM	10 mg/kg
GRUP II	Negatif	Negatif	Subklinik CMT +	* Subklinik CMT ++	İM	2 gr
	Negatif	* Subklinik CMT ++	xx	Negatif	İM	2 gr
GRUP III	Subklinik CMT ++	Negatif	Subklinik CMT +	* Klinik CMT +++	İM + İM	1 gr. 10 mg/kg
	* Klinik CMT +++	Negatif	Subklinik CMT ++	Negatif	İM + İM	1 gr. 10 mg/kg

\*: Kloramfenikol uygulanan meme lobu  
xx : Meme lobu kör



### Tartışma ve Sonuç

Yakın zamana kadar hayvansal ürünlerde bulunan antibiyotik kalıntılarının belirlenmesinde genellikle mikrobiyolojik yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler antibiyotik analizleri için oldukça duyarlı olmakla birlikte, antibiyotik düzeylerinin kantitatif olarak belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır (2, 6). Buna ilave olarak antibiyotiğe özgün spesifik yöntemler olmadıklarından birden fazla antibiyotik varlığında analizlerde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu nedenle antibiyotik analizleri için oldukça duyarlı bir yöntem olduğu anlaşılan HPLC (Yüksek Basıncılı Likit Kromatografi)'nin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (1, 2, 6, 16). Çalışmamızda da bu yöntem kullanılmıştır.

Grafik 1'de görülebileceği gibi 10 mg / kg kloramfenikolün kas içi uygulamasından sonra, sütle birlikte 8 saat süreyle kloramfenikol atılmaktadır. Sütle atılan antibiyotik miktarı enjeksiyonun yapılmasını izleyen ilk saatte 24.072 mg/L olup geçen süreye bağlı olarak giderek azalmış, 8. saatte 0.096 mg/L'ye düşmüştür. Sekizinci saatten sonra alınan süt numunelerinde ise ilaç kalıntısına rastlanılmamıştır. Grup II de her bir meme lobuna 2'şer g. kloramfenikol uygulamasından sonra alınan sütlerde, ilk saatte 488.720 mg/L, 24. saatte ise 0.019 mg/L düzeyinde kloramfenikol bulunmuş, 24. saatten sonra alınan sütlerde ise kloramfenikol kalıntısı belirlenmemiştir. Grup III'de 10 mg/L kas içi + 2g meme içi kloramfenikolün kombine uygulamasından sonra ilk saatte alınan sütlerde 784.050 mg/L, 32. saatte ise 0.038 mg/L olarak belirlenmiş, 32. saatten sonra alınan sütlerde kloramfenikol kalıntısına rastlanılmamıştır. Böylece kloramfenikolün sütle atılma sürelerinin uygulama

yollarına ve dozlarına bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Kloramfenikolün sütle atılma düzeyleri ise uygulamayı takiben giderek azalmaktadır. Wal ve ark. (16)'nın aynı amaçla keçiler üzerinde yapmış oldukları çalışmada da benzer sonuçlar alınmıştır.

ABD'de ve bazı Avrupa ülkelerinde kloramfenikol uygulamasına, sadece eti insan tüketimine sunulmayacak hayvanlarda mücade edilmektedir (2,8). Öte yandan Amerikan İlaç ve Gıda Örgütü (FDA) ve Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) da hayvansal ürünlerde kloramfenikol ilaç kalıntısının bulunmasına izin vermemektedir (3, 8, 16). Besinlerle birlikte uzun süre kloramfenikol alınması durumunda insanlarda toksik etkiler görülebileceğinden (3, 5, 7,15), kloramfenikol uygulanan hayvanlardan sütlerinin tüketilebilmesi için bu çalışmada da belirlendiği gibi kloramfenikolün sütle son atılma süresini beklemek gerekmektedir.

Sonuç olarak, ülkemizde yaygın bir şekilde kullanılan kloramfenikolün, özellikle ürünleri insan tüketimine sunulacak hayvanlarda gelişigüzel kullanılmaması; bununla beraber diğer ilaçlarla sağıtılmayan mastitis olgularında veya hastalıklarda kullanılması halinde, sütlerin değerlendirilmesi için sütle atılma sürelerine özen gösterilmesi ayrıca, gerektiğinde besin olarak tüketilen hayvansal ürünlerde, rutin antibiyotik rezidü analizlerinin yapılması ve bu amaçlarda HPCL yönteminin kolayca ve güvenli bir şekilde uygulanabileceği kanısına varılmıştır.

### Kaynaklar

- 1- Abou-Khalil, W.H., Yunis, A. A. and Abou-Khalil, S. (1988). Stability of chloramphenicol metabolites in human blood and liver as determined by HPLC. *Pharmacology*, 36, 272-278.
- 2- Acet, A., Tuncer, Ş.D., Coşkun, B., Demet, Ö, Traş, B., Baytok, E. (1989). Kloramfenikolün yumurta tavuklarında verim üzerine etkisi ve yumurtada kloramfenikol rezidülerinin aranması. *S. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 5, 1, 241 -251.
- 3- Allen, E.H. (1985). Review of chromatographic methods for Chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues from food producing animals. *JAOAC*, 68, 5, 990-999.
- 4- Anderson, K.L., Smith, A.R., Gustafsson, B.K., Spahr, S.L., and Withmore, H.L. (1982). Diagnosis and treatment of acute mastitis in a large dairy herd *JAVMA*, 181, 7, 690-693.
- 5- Becheiraz, M., Haldeman, A., und Etter, R. (1983) Bestimmung von chloramphenicol in tierischen lebensmitteln. *Mitt. Geibete. Lebens. Hyg.*, 74, 147-155.
- 6- Bories, G.F., Pelerau, Ö.J.C., Wal, J.M. (1983). Liquid chromatographic determination and mass spektrometric confirmation of chloramphenicol residues in animal tissues, *JAOAC*, 66, 6, 1521-1526.
- 7- Demet Ö., Acet, A., Traş, B., Eşilmez, I (1991) Konyada tüketime sunulan yumurtalarda kloramfenikol ve furazolidon ilaç kalıntılarının araştırılması. *S. Ü. Vet. Fak. Derg.* 1, 6-7, 61-63.
- 8- Epstein, R.L., Ashword, R.B., and Simpson, R.M. (1988). Chloramphenicol concentrations in calf muscle tissue. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 9, 2075-2077.
- 9- FAO (1988). Residues of some veterinary drugs in animal and foods. Food and nutrition paper, 41, Roma.
- 10- Haaland, M.A., Manspeaker, J.E. and Moreland, T.U. (1984). Antibiotic residues in milk after intrauterin infusion. *Vet. Med.*, 3, 382-386.
- 11- Hapke, H.J., Grawhit, G. (1987). Residues of veterinary drugs, feed additives and environmental chemical. *Animal product and Environmental Health*, 7, 219-244.
- 12- Jones, T.O. (1990) *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle-A review of the literature. *Veterinary Bulletin*, 60, 3, 205-231.
- 13- Nouws, J.F.M. and Ziv, G. (1978) A Study of chloramphenicol distribution and residues in dairy cows. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 103, 14, 725-735.
- 14- Stalberger R.I. and Kersting, K.W (1988). Peracute toxic coliform mastitis. *The Veterinary Student*, 50, 1, 48-52.
- 15- Vautier, H.E. and Pastigo, C.B. (1986) Bovine mastitis and antibiotic in milk. Risk to public health. *World Anim. Rev.*, 60, 41-42.
- 16- Wal, Ö.M. Pelerau, J.C. and Bories, G.F. (1980). High performance Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk. *JAOAC*, 63, 1044-1048.