

HIGIENA ŻYWNOSCI

TEODOR JUSZKIEWICZ, ALICJA NIEWIADOWSKA, STANISŁAW SEMENIUK,
BOGUMIŁ BIERNACKI, BOGDAN WŁODARCZYK

Stężenia chloramfenikolu w tkankach świń po domięśniowym podaniu Detreomycyny

Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Tissue concentrations of chloramphenicol in pigs after intramuscular injection of Detreomycin

Twenty pigs, averaging 25 kg, were allocated to two groups of 10 animals each and administered 25 mg/kg chloramphenicol (Detreomycin — Polfa), group I, and 50 mg Chl/kg, group II, in a single intramuscular dose. Animals were sacrificed at 6, 18, 72, 144 and 192 hours after injection time. Samples of kidney, liver, muscles, blood and urine were analyzed for the drug residues using gas chromatographic method with a detection limit of 2—10 µg/kg. Three days after the injection of 50 mg Chl/kg residues of the drug could be detected only in some samples of urine, with the exception of tissues from injection sites where the residues of 20 µg Chl/kg were demonstrated even after 8 days of withdrawal. Samples of kidneys, urine, and muscles from the injection sites were found to be preferable target sample tissues for residue analysis of Chl in pigs and food safety evaluation.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 20 prosiąt o średniej masie ciała (m.c.) 25 kg. Zwierzęta były jednakowo żywione i znajdowały się pod stałym nadzorem lekarzy weterynaryjnych, którzy wykonywali też wszelkie zabiegi doświadczalne.

Do badań użyto Detreomycyny zawierającej 25% Chl (ampułki 1,25 g/5 ml) produkcji Krakowskich Zakładów Farmaceutycznych „Polfa”. Preparat wstrzykiwano jednorazowo domięśniowo w szyję, około 5 cm za podstawą prawego ucha. Grupa I (10 zwierząt) otrzymała Chl w dawce 25 mg/kg m.c., grupa II (również 10 zwierząt) — w dawce 50 mg/kg m.c. Po upływie 6, 18, 72, 144 i 192 godzin podawano ubojowi po 2 prosięta z obu grup doświadczalnych. Do analizy pobierano próbki mięśni (*m. longissimus*), nerek, wątrób, krwi, moczu oraz mięśni z miejsca wstrzyknięcia. Do czasu wykonania analizy próbki tkanek i narządów przechowywano w stanie zamrożonym. Mocz i osocze krwi analizowano bezpośrednio po pobraniu.

Chloramfenikol, D-/-treo-2,2-dichloro-N-[beta-hydroksy-alfa-hydroksymetylo/]-p-nitrofenyloacetamid oznaczano ilościowo w badanym materiale metodą chromatografii gazowej (9). Przed wykonaniem oznaczeń próbki mięśni, wątrób i nerek mielono i dokładnie mieszano, a próbki moczu i osocza krwi rozcieńczano 2—3-krotnie wodą redestylowaną. Chl ekstrahowano z próbek octanem etylu. Po odparowaniu pozostałość rozpuszczano w roztworze chlorku sodowego. Fazę wodną przemiywano heksanem i ponownie ekstrahowano octanem etylu. W zagęszczonym do sucha ekstrakcie Chl przeprowadzano w pochodną trimetylosililową. Badane ekstrakty analizowano w chromatografii gazowej Pye Unicam 4500 z detektorem wychwyty elektroń. Stosowano kolumnę szklaną 2,1 m x 2 mm wypełnioną 5% SE-30 na Chromosorbie W HP 100/120 mesh. Metoda pozwala wykryć od 2 do 10 µg wolnego Chl w 1 kg tkanki lub 1 dm³ moczu i osocza krwi.

W pracy tej celowo nie używano beta-glukuronidazy, gdyż na skutek hydrolizy glukuronidów Chl uzyskuje się znacznie wyższe wyniki (Chl wolny plus uwolniony z glukuronidów). Procedura taka jest wprawdzie korzystniejsza dla rozważań farmakokinetycznych, lecz utrudnia ocenę wyników otrzymanych metodami tradycyjnymi przez różne laboratoria krajowe i zagraniczne.

Wyniki i omówienie

Wyniki oznaczeń zawartości Chl w tkankach, moczu i osoczu prosiąt po jednorazowym podaniu domięśniowo Detreomycyny w ilościach odpowiadających dawce 25 mg Chl/kg m.c. zestawiono w tabeli 1, a po dawce 50 mg/kg m.c. w tabeli 2.

Najwyższe stężenia Chl wykryto w badanych próbkach po 6 godz. od podania Detreomycyny. W następnych godzinach od podania leku wystąpił spadek stężeń Chl we wszystkich badanych próbkach. Po 18 godz. w wątróbach, a po 72, 144 i 192 godz. także w mięśniach, nerkach i osoczu właściwie nie wykryto już obecności Chl. Wydaje się, że niskie stężenia w wątróbach można tłumaczyć bardzo szybkim metabolizowaniem Chl w tym narządzie pod wpływem cytochromu P₄₅₀ (13). W moczu prosiąt po wyższej dawce jeszcze można było wykazać obecność Chl po 144 godz. (6 dni)

Chloramfenikol (Chl) jest względnie tanim i wielce skutecznym antybiotykiem o szerokim zakresie działania bakteriostatycznego, stosowanym w leczeniu ludzkim i do niedawna zwierzęcym przy zakażeniach wywoływanych przez bakterie, riketsje i chlamydie. W ostatnim 10-leciu zaczęły jednak pojawiać się doniesienia o toksyczności Chl u ludzi, co między innymi przejawiać się może odwracalnym uszkodzeniem czynności szpiku, a nawet niekiedy (1 przypadek na około 40 000 pacjentów) nieuleczalną niedokrwistością aplastyczną (15). Mimo braku dotychczas przekonujących dowodów naukowych na temat genotoksyczności i rakotwórczości Chl, pod wpływem nacisków zaniepokojonej opinii publicznej w wielu krajach stosowanie tego antybiotyku u ludzi i zwierząt zostało ograniczone, a nawet niektóre kraje zakazały w ogóle stosowania Chl u zwierząt rzeźnych. Zgodnie z zaleceniami międzynarodowymi Kodeksu Żywnościowego FAO/WHO w międzynarodowym obrocie handlowym nie dopuszcza się pozostałości Chl w żywności pochodzenia zwierzęcego. Eksperti FAO/WHO zrezygnowali z ustalenia wartości ADI (dopuszczalne dzienne pobranie) i MRL (maksymalny poziom pozostałości) dla Chl (14). W Polsce zarządzeniem z dnia 25 listopada 1988 r. Departament Weterynarii Min. Rol. Leś. i Gosp. Żywn. wycofał z lecznictwa weterynaryjnego chloramfenikol oraz „wszystkie preparaty, które zawierają w swym składzie tę substancję”.

Przedstawiona sytuacja stworzyła w naszym kraju konieczność prowadzenia badań nad zawartością Chl w tkankach i produktach zwierzęcych. Zaistniała również potrzeba wykonania doświadczeń na zwierzętach celem określenia przebiegu zanikania Chl w tkankach zwierząt i wyboru najbardziej przydatnego materiału biologicznego do wykrywania jego obecności.

Tab. 1. Stężenia chloramfenikolu (Chl) w tkankach, moczu i osoczu świń w mg/kg lub mg/dm³ po jednorazowym podaniu domięśniowo dawki 25 mg Chl/kg m.c.

Czas godz.	Nr zwierz.	Nerki	Wątroba	Mięśnie *	Mocz	Osocze	Mięśnie **
6	1	2,07	0,02	1,37	no	0,80	215,05
	2	2,92	0,03	1,65	4,40	1,54	308,07
18	3	0,07	ns	0,34	2,77	0,37	5,63
	4	ns	ns	0,01	0,03	ns	0,09
72 (3d)	5	ns	ns	0,01	ns	ns	ns
	6	ns	ns	ns	ns	ns	ns
144 (6d)	7	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	8	ns	ns	ns	no	ns	ns
192 (8d)	9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	10	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Objaśnienia: * — *m. longissimus*, ** — z okolicy wstrzyknięcia, ns — nie stwierdzono (poniżej 0,01 mg/kg), no — nie oznaczono, brak próbek.

Tab. 2. Stężenia chloramfenikolu (Chl) w tkankach, moczu i osoczu świń w mg/kg lub mg/dm³ po jednorazowym podaniu domięśniowo dawki 50 mg Chl/kg m.c.

Czas godz.	Nr zwierz.	Nerki	Wątroba	Mięśnie *	Mocz	Osocze	Mięśnie **
6	11	11,56	0,04	7,98	no	7,22	124,74
	12	8,71	0,01	6,22	170,02	4,20	660,48
	13	1,33	ns	0,48	3,72	2,45	33,94
18	14	0,04	ns	0,03	0,17	0,02	0,72
	15	ns	ns	ns	no	ns	0,11
72 (3d)	16	ns	ns	ns	0,02	ns	0,02
	17	ns	ns	ns	no	ns	0,09
144 (6d)	18	ns	ns	ns	0,04	ns	0,16
	19	ns	ns	ns	no	ns	0,02
192 (8d)	20	ns	ns	ns	ns	ns	0,02

Objaśnienia: jak w tab. 1.

od podania. Ocena stężeń i czasu utrzymywania się Chl w moczu jest utrudniona, gdyż nie udało się uzyskać próbek moczu od wszystkich badanych prosiąt.

Jak można było przypuszczać najwyższe stężenia występowały w próbkach mięśni z okolicy wstrzyknięcia Detreomycyny. Po dawce 50 mg Chl/kg m.c. pozostałości leku utrzymywały się przez cały 8-dniowy okres badań. Najwyższe stężenia chloramfenikolu w miejscu wstrzyknięcia wykryte po 6 godz. wynosiły 660 i 308 mg/kg, spadając po 8 dniach do 0,02 mg/kg.

Stwierdzane stężenia różniły się zarówno między zwierzętami po tej samej dawce, jak i po upływie tego samego czasu od podania leku. Po stosowaniu Detreomycyny w 2-krotnie wyższej dawce pozostałości chloramfenikolu w badanym materiale utrzymywały się najczęściej na kilkakrotnie wyższym poziomie niż po niższej dawce.

Zastosowane w doświadczeniu dawki Chl należy zaliczyć do dawek zbliżonych do leczniczych (11, 12, 16). Już w 1961 r. Gorzelewska i Juszkievicz wykazali, że Chl jest szybko wydalany z ustroju poszczególnych gatunków zwierząt (6). Znalazło to potwierdzenie w późniejszych badaniach innych autorów (3, 5, 7, 16). Niemniej pozostałości Chl mogą w zależności od gatunku zwierzęcia, drogi podawania czy postaci chemicznej związku utrzymywać się w różnych tkankach, mleku i jajach od kilku godzin i dni do nawet kilku tygodni (5, 7, 10, 14). Nouws i wsp. na podstawie własnych badań farmakokinetycznych zalecają u krów mlecznych okres karencji 7 dni dla mleka i mięsa. Nie należy jednak zapominać, że w okolicy wstrzyknięcia Chl pozostałości występują w najwyższych stężeniach i utrzymują się najdłużej. Korsrud i wsp. stwierdzali u cieląt po 42 dniach od zaprzestania stosowania Chl

pozostałości we wszystkich próbkach z miejsca wstrzyknięcia. Dopiero po 70 dniach wyniki analiz były ujemne. Autorzy przeciwstawiają swoje wyniki okresom karencji obowiązującym wówczas w Kanadzie (5 dni) i w RFN (10 dni). Jak już wspomniano, coraz więcej krajów wykreśla Chl ze spisu leków weterynaryjnych i tym samym nie dopuszcza do obrotu żywności z pozostałościami tego antybiotyku. Zmusza to weterynaryjną inspekcję sanitarną do korzystania z dobrze zorganizowanego systemu kontroli pozostałości, który potrafi ilościowo oznaczać stężenia Chl już w zakresie 1–10 µg/kg.

W opisywanych badaniach własnych Chl utrzymywał się w tkankach prosiąt przez okres co najmniej 3 dni, a w mięśniach z okolicy wstrzyknięcia przez cały 8-dniowy okres badań. Z badań tych wynika również, że mięśnie, nerki i mocz to najbardziej przydatny materiał biologiczny do wykrywania pozostałości Chl. Wniosek ten potwierdzają badania innych autorów (5, 8), chociaż z pracy Boriesa i wsp. wynikałoby, że u drobiu po 4 i 6 godz. najwyższe stężenia wykrywano w wątrobie, niższe w tłuszczu, a najniższe w mięśniach. Po 8 godz. w mięśniach nie stwierdzano obecności Chl, a w tłuszczu występował on na wyższym poziomie niż w wątrobie (2).

Niektórzy autorzy donoszą o obniżaniu się zawartości Chl w próbkach zamrożonych i przechowywanych w różnych przedziałach czasowych (1, 8). Jest to cenna uwaga dla analityków i prowadzących badania eksperymentalne, jak również dla higienistów żywności. Przetwórstwo mięsa skażonego (peklowanie, temperatura) prowadzi do strat zawartości chloramfenikolu o co najmniej 50%, a proces przygotowywania konserw do jego całkowitego zaniku (4).