

Koyunlara Uygulanan Florfenikolün Farmakokinetiği[#]

Yavuz Osman BİRDANE^{1*}, Fatih Mehmet BİRDANE², Mehmet ÖZDEMİR¹,
Mustafa KABU², Hidayet YAVUZ¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar /TÜRKİYE

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Afyonkarahisar /TÜRKİYE

[#]Bu araştırma makalesi, AKÜ BAPK tarafından 042 VF 016 nolu proje ile desteklenmiştir. İkinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresinde 6-8 Eylül 2007 tarihinde Samsun'da sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

ÖZET

Florfenikol; tiamfenikol ve kloramfenikole dirençli enterik bakterileri de içine alan geniş spektrumlu ve tiamfenikolün tek florlu yapısal analogudur. Bu çalışmada 30 mg/kg tek doz İV yol ile uygulanan florfenikolün koyunlardaki farmakokinetik parametreleri belirlendi. Florfenikolün plazmadaki konsantrasyonları, UV detektörü bulunan, dalga boyu 223 nm olan yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) de belirlendi. İlaç uygulamasını takiben 5., 10., 15., 20., 30., 45. dakikalar ile 1., 1.5, 2., 3., 4., 6., 8., 10., 12., 14., 18., 24., 30. saatlerde kan örnekleri alındı. İV uygulamadan sonra HPLC tarafından belirlenen plazmadaki ilaç konsantrasyonlarından elde edilen plazma-zaman konsantrasyon verileri iki kompartmanlı modele göre değerlendirildi. İV uygulama yolu ile 30 mg/kg uygulanan florfenikolün farmakokinetik parametreleri ise eliminasyon yarılama ömrü ($t_{1/2\beta}$) 3.34 ± 0.25 saat, ortalama kanda kalış zamanı (MRT) 3.68 ± 0.07 saat, denge halindeki dağılım hacmi (V_{dss}) 0.97 ± 0.07 kg/l, vücut klirensi (Cl) 0.26 ± 0.008 l/h/kg, eğrinin altında kalan ($AUC_{0-\infty}$) ise 113.13 ± 3.45 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Farmakokinetik, Florfenikol, Koyun



Pharmacokinetic of Florfenicol After Administration in Sheep

SUMMARY

Florfenicol a monofluorinated analogue of tiamphenicol, has antibacterial activity against a broad spectrum of bacterial strains, including enteric bacteria that are resistant to chloramphenicol and tiamphenicol. Pharmacokinetic parameters of florfenicol were determined in sheep after administration a single intravenous (IV) doses 30 mg/kg body weight. Florfenicol concentrations in plasma were determined by a validated high-performance liquid chromatography (HPLC) methods with UV detection at a wavelength of 223 nm. Blood samples were obtained at 5., 10., 15., 20., 30., 45. minutes ile 1., 1.5, 2., 3., 4., 6., 8., 10., 12., 14., 18., 24., 30. hours after injection. Plasma concentration-time data after iv administration were best described by a two-compartment open model. Concentrations of the drug in plasma were determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters were as follows: elimination half life ($t_{1/2\beta}$) was 3.34 ± 0.25 hours, mean residence time (MRT) was 3.68 ± 0.07 hours, mean volume of distribution at steady-state (V_{dss}) was 0.97 ± 0.07 kg/l, total body clearance (CL) 0.26 ± 0.008 l/h/kg, area under curve (AUC) 113.13 ± 3.45 $\mu\text{g}\cdot\text{saat}/\text{ml}$ after iv injections of 30 mg/kg doses weight.

Key Words: Pharmacokinetic, Florfenicol, Sheep

GİRİŞ

Florfenikol veteriner sahada kullanılan, gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı bakteriyostatik etki gösteren geniş spektrumlu yeni bir antibakteriyel ilaçtır (Atef ve ark 2001).

Florfenikol veteriner sahada uzun yıllar kullanılan tiamfenikol ve kloramfenikolün yapısal analogudur. Kloramfenikolün yapısında bulunan p-nitro grubunun yerine p-methyl sulfonil grubu, hidroksil grubunun yerine de florin atomu yer almaktadır. Bu yapısal farklılık florfenikole, kloramfenikolde görülen yan etkilerin ortadan kalkması ve bakterilere karşı daha güçlü etki etmesi gibi üstünlükler kazandırmaktadır. Tiamfenikol ve kloramfenikol gibi bakterilerin ribozomlarına bağlanan florfenikol, peptidil transferaz enzimini bloke eder ve böylece protein sentezini engelleyerek etkisini gösterir (Shen ve ark 2002, Craene ve ark 1997).

Florfenikolün dokulardaki dağılımı oldukça iyidir. Özellikle akciğer, kalp, pankreas, iskelet kasları, dalak gibi organlara yoğun olarak geçmektedir. Dokulardaki konsantrasyonu en az serumdaki konsantrasyonları kadar yüksektir. Buzağılarda yapılan çalışmalarda da florfenikolün serebrospinal sıvıya yüksek oranda geçtiği belirlenmiştir (Craene ve ark 1997). Proteine bağlanma oranı % 12.7-18.6 arasındadır. Florfenikolün yaklaşık %64' ü idrarla bir kısmında feçesle atılır (Sams 1994).

Kloramfenikol, özellikle solunum yolu enfeksiyonlarında uzun yıllar kullanılmıştır. Ancak bu antibiyotik doza bağlı olarak reverzibl kemik iliği süprasyonuna, doza bağlı olmaksızın da aplastik anemiye neden olduğu için eti yenen hayvanlarda kullanımı yasaklanmıştır. Florfenikolün patojen mikroorganizmalara karşı invitro etkisinin kloramfenikol ve tiamfenikolden daha geniş olduğu ve bronşiyal sekresyonlardaki düzeyinin solunum hastalıklarına neden olan primer patojenler için gerekli olan minimum inhibitör konsantrasyonlardan daha fazla olduğu bildirilmektedir (Craene ve ark 1997, Vogel ve Parrott 1994).

Florfenikol ile yapılan *invitro* ve *invivo* çalışmalarda *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* ve *Haemophilus somnus* gibi bakterilere etkisinin güçlü olduğu bildirilmiştir. *Invitro* yapılan çalışmalarda *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus agalactia*, *Streptococcus dysgalactia*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris* ve *Shigella dysenterica* bakterilerine karşı kloramfenikol ve tiamfenikolden daha etkili olduğu belirlenmiştir (Balton ve ark 1999, White ve ark 2000).

Sığır yetiştiriciliğinde solunum yolu hastalıklarına bağlı kayıpların oranı % 37-52 olarak belirlenmiştir (Vogel ve Parrott 1994). Sığırlardaki solunum yolu hastalıklarında florfenikolün, amoksisilin, enrofloksasin ve oksitetrasikline göre terapötik etkinliğinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Florfenikol, özellikle bakteriyel pnemoni ve *Fusobacterium necrophorum* ve *Bacteroides melaninogenicus* bakterilerinden ileri gelen pododermatitis gibi ayak hastalıklarında kullanılmaktadır. Tavuklarda özellikle *Salmonella* ve *E.coli* bakterilerinden kaynaklanan enfeksiyöz hastalıklarda (Keyes ve ark 2000, Shen ve ark 2002, Afifi ve Abo el-Sooud 1997) ve balıklarda *Pasteurella piscicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* ve *Edwardsiella tarda* gibi bakterilerin neden olduğu enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Vue ve ark 2002, Ho ve ark 2000). İntravenöz yolla uygulanan florfenikolün dağılım hacmi (Vd) buzağılarda 0.88-0.91 L/kg (Lobell ve ark 1994, Adams ve ark 1987), keçilerde 0.98-L/kg (Lavy ve ark 1991) ve *Salmon* balıklarında 1.12 L/kg belirlenmiştir. Eliminasyon yarılanma ömrü buzağılarda 2.3-3.71 saat, sığırlarda 2.9-3.2 saat (Bretzlaff ve ark 1987), keçilerde 2.3 saat ve *salmon* balıklarında 12.2 saat olarak tespit edilmiştir. Ayrıca sığırlardaki klirensi ise 2.7 ml/dakika/kg bulunmuştur (Varma ve ark 1991, Soback ve ark 1995). İntramusküler uygulamada ise buzağılardaki yarılanma ömrü 18.3 saat olarak bildirilmiştir.

Florfenikol üretici firma tarafından sığırlarda kullanılmak üzere üretilmiştir. Ancak süregelen araştırmalarda diğer hayvan türlerinde de kullanılabileceği bildirilmiştir. Koyunlarda yapılan farmakokinetik çalışmalar yeterli değildir. Hayvancılık sektörümüzde koyunların önemli bir yeri vardır. Özellikle sürü faktörü de dikkate alındığında solunum yolu hastalıkları, ayak hastalıkları ve florfenikole duyarlı bakterilerin oluşturduğu diğer enfeksiyonlarda florfenikol kullanılabilir. Bu çalışma ile florfenikolün koyunlardaki farmakokinetik parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada florfenikol verilecek koyunlardan belirli zamanlarda kan örnekleri alınarak kan konsantrasyonu / zaman eğrisi çizildikten sonra pik konsantrasyonu (C_{max}), eğri altında kalan alan (EAA), eliminasyon yarılanma ömrü ve dağılım hacmi (V_{dss}) gibi farmakokinetik parametreleri değerlendirilecektir.

MATERYAL VE METOD

Araştırma 6 adet 12-15 aylık koyun üzerinde gerçekleştirildi. Koyunlar önceden hazırlanan yerlere alınarak 10 gün boyunca standart bir rasyonla beslendi. Florfenikol koyunlara 30 mg/kg dozunda

İV yolla uygulandı. Uygulamayı takiben 5.,10 15., 20., 30., 45. dakikalar ile 1., 1.5, 2., 3., 4., 6., 8., 10.,12, 14, 18, 24, 30. saatlerde heparinli tüplere kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinin plazmaları alınarak analiz edilene kadar -20°C'de saklandı. Plazma florfenikol ekstraksiyonu ve düzeyleri Craene ve ark (1997)'nin, önerdikleri yöntemle göre belirlendi. Buna göre 250 µl plazmanın üzerine 750 µl fosfat buffer solüsyonu (Ph:7) ve iç standart solüsyon olarak 40 µl kloramfenikol eklenerek birkaç dakika vorteksle karıştırıldı. Karışım daha önce 2 ml metanol ve 2 ml acetonitril ile yıkanmış Bond elut C₁₈ ekstraksiyon kartuşundan geçirildi Kartuş 2ml su-acetonitril (85/15 v/v) ve 3 ml hexan ile yıkandı. Daha sonra 3 ml acetonitril ve 4ml etil asetat ile yıkanarak elde edilen solüsyon rotary evaporatörde uçuruldu.. Elde edilen kalıntı 500 µl su-acetonitril (77/23 v/v) ile tekrar sulandırılarak polivinilidin diflorid filtresinden geçirildi. Mobil faz; asetonitril ve su ile hazırlanarak mobil faz süzme düzeneğinden süzüldü. Son olarak elde edilen sıvının 100 µl' si HPLC ye uygulanarak ve florfenikol miktarları tespit edildi.. Elde edilen florfenikol miktarları ile farmakokinetik parametreleri belirlendi.

Florfenikol ölçümü için HPLC parametreleri

Serum örneklerdeki ilaç konsantrasyonlarının belirlenmesinde, HPLC (Yüksek Basıncılı likit kromatografi diode array dedektör, Dionex) kullanıldı.

Dedektör: diode array (DAD) -UV –Vis dedektör.

Kolon: Dionex C 18 , 250 x 4.6 mm

Dalga boyu: 223 nm

Mobil faz: Asetonitril, su 27/63, v/v)

Akış hızı : 1. ml/dakika

Farmakokinetik Hesaplamalar

Florfenikolün uygulanmasından sonra zamana göre serum ilaç eğrisinin "iki kompartımanlı dışa açık model" e uygunluk gösterdiği belirlendi. Farmakokinetik değişkenlerin belirlenmesinde Wagner (1975) tarafından bildirilen eşitliklere göre (GW-Basic 2.02) ve Shumaker (1986)' e göre (PKCALC 1987) hesaplama yapan iki farklı bilgisayar programı kullanıldı. Florfenikolün Dİ yolla verilmesini takiben her bir hayvanın serum yoğunluk

- zaman eğrileri çizildikten sonra aşağıdaki temel eşitlikler üzerinden farmakokinetik değişkenler hesaplandı.

$$Y = A_1 e^{-\alpha t} + A_2 e^{-\beta t} \quad Dİ$$

Bu formüllerde Y yoğunluğu, A₁, A₂ matematik katsayıları, α dağılım dönemindeki eğrinin eğimi (dağılım hız sabitesi), β atılma dönemindeki eğrinin eğimi atılım hız sabitesi ifade etmektedir.

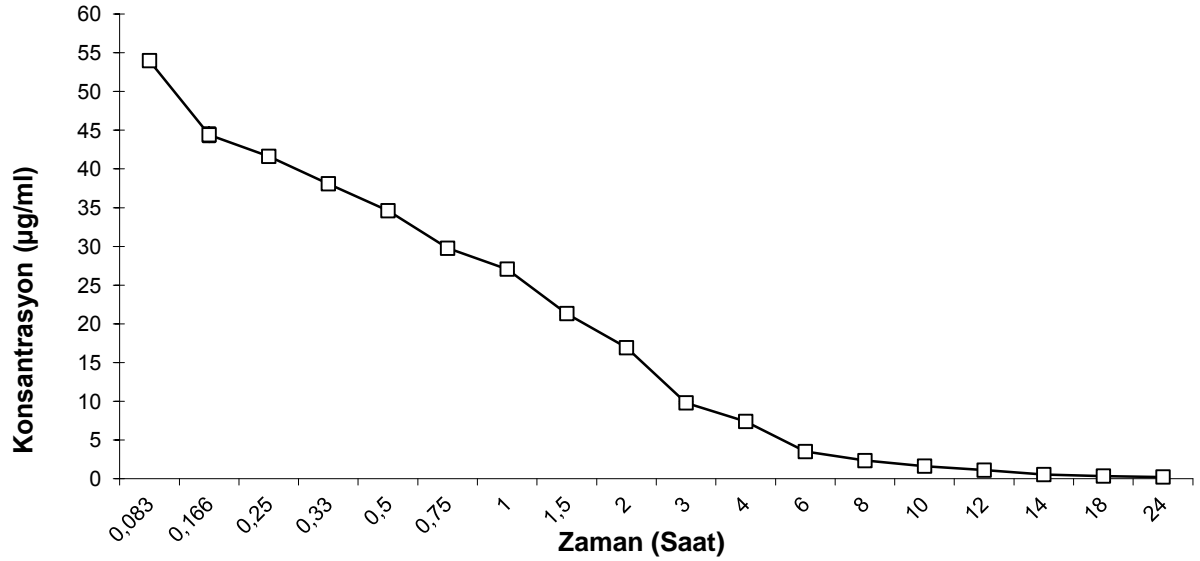
Uygulamadan sonra elde edilen eğrinin altındaki alan (EAA) değerleri, T₀'dan T_∞'a kadar değişen zamanda trapez metoduna göre hesaplandı. Farmakokinetik değişkenlerden eliminasyon yarı ömrü (t_{1/2β}), ortalama kalış süresi (MRT), kararlı durumdaki dağılım hacmi (V_{dss}), toplam serum klirensi (Cl), serum pik konsantrasyonu (C_{max}) Dİ yolla uygulanan florfenikolün vücuttaki davranışlarını karşılaştırmak için değerlendirmeye alındı. Bulunan sonuçlara descriptives istatistik yapılarak ve standart (SD) değerleri kullanıldı.

SONUÇLAR

Flofenikolün İV yol ile uygulanmasını takiben elde edilen serum ilaç konsantrasyonları ve C_{max} Grafik.1 de, farmakokinetik değişkenler ise Tablo.1'de gösterilmiştir. Serbest florfenikolün uygulamasından sonra serum örneklerinde ölçülebilir en düşük konsantrasyon 24.saatte belirlendi.

İV uygulama yolu ile 30mg/kg dozunda uygulandıktan sonra HPLC tarafından belirlenen plazmadaki ilaç konsantrasyonlarından elde edilen plazma-zaman konsantrasyon verileri iki kompartmanlı modele göre değerlendirildi.

İV uygulama yolu ile uygulanan florfenikolün farmakokinetik parametreleri ise eliminasyon yarılama ömrü (t_{1/2β}) 3.34±0.25 saat, ortalama kanda kalış zamanı (MRT) 3.68±0.07 saat, denge halindeki dağılım hacmi (V_{dss}) 0.97±0.07 kg/l, vücut klirensi (Cl) 0.26 ±0.008 l/h/kg, eğrinin altında kalan (AUC_{0-∞}) ise 113.13±3.45 µg.h/ml olarak bulunmuştur



Grafik 1. Koyunlara 30 mg/kg dozunda intravenöz (İV) florfenikol uygulamaları ile elde edilen plazma Florfenikol düzeyleri.

Figure 1.

Tablo1. Koyunlara 30mg/kg dozunda intravenöz (İV) serbest florfenikol ile elde edilen farmakokinetik parametreler (Ortalama \pm Standart Hata)

Table 1.

| Parametre | Değerler (SE) |
|----------------------------------|-------------------|
| AUC _{0-∞} (µg.saatt/ml) | 113.13 \pm 3.45 |
| V _{d(ss)} (l/kg) | 0.97 \pm 0.07 |
| t _{1/2β} (saat) | 3.34 \pm 0.25 |
| MRT (saat) | 3.68 \pm 0.07 |
| Cl (l/saat/kg) | 0.26 \pm 0.008 |

EAA_{0-∞}; eğrinin altında kalan alan, V_{d(ss)}; kararlı durumdaki dağılım hacmi, t_{1/2β};eliminasyon yarı ömrü, MRT; ortalama kalış süresi, Cl; toplam klirens.

TARTIŞMA

Yapılan çalışmada, koyunlara intravenöz(İV)yol ile verilen florfenikolün elde edilen farmakokinetik özellikleri, iki kompartmanlı açık modele uygunluk gösterdi (Ali ve ark 2003, Atef ve ark 2001) Çalışmamızda plazma-zaman konsantrasyonu ile çizilen eğrinin altında kalan alan(AUC) 113.13 \pm 3.45 µg.saatt/ml bulundu. Jianzhong ve ark (2004) koyunlara uygulayıp bulduğu AUC ile 119.21 \pm 2.05 µg.saatt/ml ile benzerlik göstermektedir. Aynı şekilde Lane ve ark (2004) koyunlara uyguladığı 40 mg/kg

dozundaki florfenikolün AUC değeri (106 µg.saatt/ml) ile Craene ve ark (1997) buzağılardaki buldukları AUC değeri (97.52 µg.saatt/ml) ile uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda kararlı durumdaki dağılım hacmi V_{d(ss)} değeri 0.97 \pm 0.07 L/kg olarak saptanmışken, Jianzhong ve ark (2004) koyunlardaki bu değeri 1.71 \pm 0.20 L/kg, Ali ve ark (2003) ise 0.69 0.97 \pm 0.07 L/kg olarak bildirmişlerdir. Sonuçlarımızın Jianzhong ve ark (2004)'nın sonuçlarından farklı olması muhtemelen araştırmacıların farmakokinetik özelliği üçlü kompartmanlı modele göre belirlemesinden ve kullanılan hayvanın ırkından kaynaklanmaktadır.

Eliminasyon yarılama ömrü (t_{1/2β}) 3.34 \pm 0.25 saat bulunmuştur. Atef ve ark (2001) keçilerde yarılanma ömrünü 156.48 \pm 8.676 dakika olarak bulmuşlardır. Sonuçlar benzerlik arz etmektedir. Craene ve ark(1997)'nin buzağılardaki buldukları t_{1/2β} (3.18 saat) sonuç ile de uyumluluk göstermektedir.

Ortalama kalış süresi (MRT) 3.68 \pm 0.07 saat olarak bulunmuştur. Ali ve ark (2003) koyunlardaki yaptıkları çalışmada MRT değerini 3.42 \pm 0.39 saat bulmuşlardır. Bizim bulduğumuz sonuçlara oldukça benzerlik göstermektedir. Craene ve ark(1997) da buzağılarda MRT değerini 3.92 \pm 1.34 saat bulmuşlardır.

Çalışmamızda klirens (Cl) 0.26 \pm 0.008 l/kg/ saat olarak bulunmuştur. Lane ve ark (2004) nın

koyunlara uyguladığı 40 mg/kg dozundaki florfenikolün klirensi (0.36 l/kg/saat) ile, Jianzhong ve ark (2004)'ün koyunlara uygulayıp bulduğu klirens (0.25 l/kg/saat) ile benzerlik göstermektedir. Aynı şekilde Ali ve ark (2003) koyunlardaki yaptıkları çalışmada da klirens değeri 0.30 l/kg/saat olarak bulmuşlardır.

SONUÇ

Florfenikolün koyunlardaki farmakokinetiği ile ilgili çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Hayvancılık sektörümüzde önemli yeri olan koyunlarda sürü faktörü de dikkate alındığında özellikle solunum yolu enfeksiyonları, ayak hastalıkları ve florfenikole duyarlı bakteriler tarafından oluşturulan diğer enfeksiyonlarda kullanılan florfenikolün koyunlarda rahatlıkla kullanılabilmesi için farmakokinetik çalışmaların yapılması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams PE, Varma KJ, Powers TE.** Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in male veal calves given repeated doses. *Am.J.Vet.Res.* 1987; 48(12): 1725-1732.
- Afi NA, Abo el-Sooud KA.** Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *Br. Poult Sci.* 1997; 38(4): 425-428.
- Ali BH, Al-qarawi, Hashaad M.** Comparative plasma pharmacokinetics and tolerance of florfenicol following intramuscular and intravenous administration to camel, sheep and goats. *Veterinary research communications.* 2003; 27(6): 475-483.
- Atef M, El- Gendi AY, Amer AM, el-aty AM.** Disposition kinetics of florfenicol in goats by using two analytical methods. *J.Vet. Med. A Physiol Pathol Clin Med.* 2001; 48(3):129-136.
- Balton LF, Kelley LC, Lee MD, Fedorka-Cray PJ.** Detection of multidrug-resistant salmonella enterica serotype typhimurium DT104 based on a gene Which confers cross-resistance to florfenicol and chloramfenicol. *J. of Clin. Microb.* 1999; 37(5): 1348-1351.
- Bretzlaff KM, Neff-Davis CA, Ot RS.** Florfenicol in nonlactating dairy cows: pharmacokinetics, binding to plasma proteins and effects on phagocytosis by blood neutrophils. *J.Vet.Pharmacol.Ther.* 1987; 10: 233-240.
- Craene BA, Deprez P, Dhaese E, Nelis HJ, Leenheer AP.** Pharmacokinetics of florfenicol in cerebrospinal fluid and plasma of calves, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 1997; 41(9): 1991-1995.
- Ho SP, HSU TY, Chen MH, Wang WS.** Antibacterial effect of chloramfenicol, tiamfenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. *J.Vet. Med. Sci.* 2000; 62(5): 479-485.
- Jianzhong S, Xiubo L, Haiyang J, Walter HH.** Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in healthy sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2004; 27(3): 163-168.
- Keyes K, Hudson C, Maurer JJ, Thayer S, White DG, Lee MD.** Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 2000; 44(2):421-424.
- Lane VM, Wetzlich S, Clifford A, Taylor I, Craigmill AL.** Intravenous and subcutaneous pharmacokinetics of florfenicol in sheep. 2004; 27(4): 191-196.
- Lavy E, Ziv G, Soback S** Clinical pharmacology of florfenicol in lactating goats. *Acta. Vet. Scand.* 1991; 87: 133-136.
- Lobell Rd, Varma KJ, Johnson JC.** Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle. *J.Vet. Pharmacol. Ther.* 1994; 17: 253-258.
- Sams RA.** Florfenicol: Chemistry and metabolism of a novel broad-spectrum antibiotic. In: *Proceedings of the XVIII World Buiatrics Congress Bologna Italy 13-17.* 1994.
- Shen J, Wu X, Hu D, Jiang H.** Pharmacokinetics of florfenicol in healthy and *Escherichia coli* infected broiler chickens. *Research in Veterinary Science.* 2002; 73: 137-140.
- Shumaker RC.** PKCALC: A Basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data, *Drug Metabol Rev.* 1986; 17: 331-48.
- Soback S, Paape MJ, Filep R, Varma KJ.** Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous intramuscular and intramammary administration. *J.Vet. Pharmacol.* 1995; 18(6): 413-417.
- Varma KJ, Sams RA, Lobell RD.** Pharmacokinetics and efficacy of a new broad spectrum antibiotic florfenicol in cattle. *Acta. Vet Scand.* 1991; 87: 102-104.
- Vogel GJ, Parrott JC.** Mortality survey in feedyards The incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards on

the great plains Compend. Contin. Educ. Pract Vet. 1994; 16 (2): 227-234.

Vue C, Schmidt LJ, Stehly GR, Gingerich WH
Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish. Journal of Chromatography B. 2002; 780: 111-117.

Wagner JG. Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics, Drug Intelligence Pub Inc, Illinois, USA. 1975.

White DG, Hudson C, Maurer JJ, Ayers S, Zhao S, Lee MD, Bolton L, Foley T, Sherwood J. Characterization of cloramphenicol and florfenicol resistance in E.coli Associated with bovine diarrhea. J. of Clin. Microb. 2000; 38(12): 4593-4598.