

# RESIDUOS TISULARES DE FLORFENICOL TRAS SU ADMINISTRACIÓN ORAL EN POLLOS PARRILLEROS

Mestorino N<sup>1,2</sup>, Daniele M<sup>1</sup>, Errecalde JO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias.  
Universidad Nacional de La Plata Calle 60 y 118, CC 296, 1900  
La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Católica de Cuyo.  
San Luis. Argentina.

**RESUMEN:** Para evaluar la persistencia de niveles residuales de florfenicol en tejidos, se utilizaron pollos tratados con Ceflorsol® por vía oral (10 mg/kg de peso corporal) durante cinco días. Veinticinco pollos tratados fueron sacrificados a diferentes tiempos entre 24 y 120 h post-tratamiento, se obtuvieron muestras de músculo, piel/grasa, hígado, riñón y pulmón. Previamente al ensayo del florfenicol, se validó el método cromatográfico (HPLC). Después de múltiples dosis PO, las concentraciones de florfenicol persistieron en pulmón, piel/grasa y músculo por arriba de límite máximo de residuos establecido hasta los 5 días post-tratamiento. La persistencia de residuos de florfenicol, como la de otros medicamentos, en tejidos comestibles por encima de los niveles permitidos desempeña un importante papel en la seguridad alimentaria, ya que, concentraciones elevadas podrían dar lugar a posibles riesgos para la salud. Por esto es fundamental que se realicen estudios de persistencia de niveles residuales y determinación de periodos de retirada rigurosos para todos los medicamentos veterinarios utilizados en animales de consumo. Un tiempo de espera de 8 días es necesario para garantizar que los residuos de florfenicol estén por debajo de los LMR establecidos por la EMEA. **Palabras clave:** florfenicol, pollos parrilleros, residuos, HPLC, tiempo de espera

## TISSUE RESIDUES OF FLORFENICOL AFTER ORAL ADMINISTRATION IN BROILER CHICKENS

**ABSTRACT:** Chickens were used to investigate the persistence of tissue residues of florfenicol after receiving an oral dose of Ceflorsol® (10 mg/kg body weight) for five days. Twenty-five chickens were treated and slaughtered at different times between 24 and 120 h after treatment; samples of muscle, skin/fat, liver, kidney, and lung were collected. A high-performance liquid chromatography method was validated before florfenicol assay. After multiple oral doses in lung, muscle and skin/fat concentrations persisted over maximal residue limits (MRL) for 5 days. The presence of residues of florfenicol in edible tissues, above the MRLs, as happens with all veterinary drugs, can play an important role in human food safety, because concentrations above the permitted levels could give rise to a possible health risk. That is why critical residue studies, determining withdrawal periods should be run for all veterinary drugs used in consumption animals. A withdrawal time of 8 days was necessary to ensure that the residues of florfenicol were less than de MRL established by the EMEA. **Keywords:** Florfenicol, chickens broilers, residues, HPLC, withdrawal time

## INTRODUCCIÓN

El florfenicol (FLF) es un antimicrobiano perteneciente a la familia de los fenicoles (cloranfenicol y tianfenicol), con acción frente a *Pasteurella*, *Salmonella*, *E.coli* y *Staphylococcus aureus* (10, 11, 14). Al prohibirse el empleo del cloranfenicol (CAF) en animales productores de alimento en los Estados Unidos y Canadá, se acentuó la necesidad de disponer de un antibiótico efectivo y de amplio espectro para ser utilizado en animales destinados al consumo humano<sup>(8)</sup>. El FLF es un análogo estructural del tianfenicol (TAF), que surge del reemplazo del grupo hidroxilo a nivel del carbono tres del TAF por un átomo de flúor, el FLF es D-d-treo- 3- fluoro-2-dicloroacetamida-1-(4 metilsulfonilfenil)-1-propanol (Fig. 1). Esta modificación mejora el espectro de actividad antibacteriana y elimina la resistencia bacteriana causada por la presencia de cloranfenicol acetiltransferasa en organismos resistentes<sup>(8)</sup>.

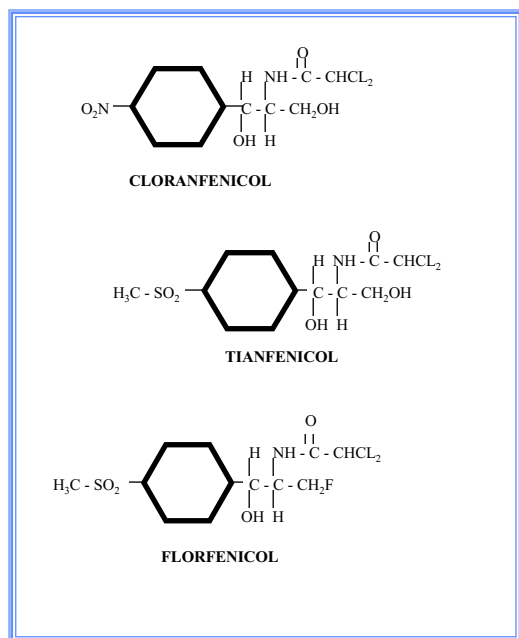


Fig. I: Estructura química del cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol

Es sabido que el CAF causa, tanto en el hombre como en los animales, depresión reversible de la médula ósea, dosis dependiente, por

un mecanismo relacionado con la inhibición de la síntesis proteica (15, 8). Otro efecto tóxico, sumamente importante y reportado solo en el hombre es la anemia aplásica irreversible, dosis independiente, ocasionada por un mecanismo aún no muy bien dilucidado (15). Esta anemia aplásica es el principal factor por el cual la FDA (Food and Drug Administration) en los Estados Unidos ha prohibido su uso en animales productores de alimentos.

La molécula de FLF tiene la capacidad de fijarse a proteínas tisulares, siendo la fracción libre reabsorbida desde los túbulos renales, por lo que tiende a acumularse en tejidos (8). La Unión Europea estableció los siguientes límites máximos de residuos (LMR) en todas las especies productoras de alimentos incluyendo pollos: 100 ng/g en músculo, 200 ng/g en piel/grasa, 750 ng/g en riñón y 2500 ng/g en hígado (EMEA/MRL/822/02-FINAL).

En Avicultura, la cría intensiva de diversas especies aviares, hace necesario muy a menudo el uso de agentes antimicrobianos con fines profilácticos y/o terapéuticos. El ciclo tan corto, unas siete semanas, en el caso del pollo parrillero o broiler hace que la más mínima infección o retraso en el crecimiento de las aves se traduzca en cuantiosas pérdidas económicas para el productor, lo que incide en el uso de medidas profilácticas. En este sector avícola, el cloranfenicol jugaba un papel muy importante por ser un fármaco de amplio espectro de acción antimicrobiana, que incluía algunos de los microorganismos de mayor incidencia en patología infecciosa de las aves como enterobacterias, y por ser un fármaco con buenas propiedades farmacocinéticas, tales como una excelente distribución orgánica. Hoy en día con la prohibición del cloranfenicol y otros agentes quimioterápicos utilizados en la profilaxis y terapéutica de aves podemos sugerir que empieza a haber un cierto vacío terapéutico en medicina aviar.

El conocimiento de la farmacocinética y de los residuos de un agente terapéutico se hace del todo necesario, de forma que su utilización se haga bajo unas bases definidas de eficacia y seguridad. De hecho, la falta de conocimiento de la farmacocinética de un medicamento, puede conllevar que un compuesto farmacológicamente idóneo, se someta a un irracional régimen terapéutico, y provoque una actividad

o eficacia deficiente, o bien dé lugar a una toxicidad inaceptable.

Desde el punto de vista clínico y toxicológico, la farmacocinética es el estudio de los factores que deben considerarse para conseguir niveles de un fármaco óptimos, predecibles, terapéuticamente eficaces y seguros, a partir de la forma de administración del medicamento.

Los datos concernientes a la cinética de depleción de residuos en fluidos orgánicos y en tejidos de animales productores de alimentos son básicos para establecer, basándose en los niveles tolerables, los tiempos de espera o de retirada que aseguren unos niveles residuales tisulares por debajo de los LMRs fijados por los organismos de control.

Conjuntamente, los estudios de toxicidad marcan la base para el establecimiento del LMR. Los LMR conciernen a la seguridad de los residuos de la sustancia en alimentos destinados al hombre y también sobre el proceso tecnológico e industrial de los alimentos. Los LMR de los medicamentos de uso veterinario deben especificar el residuo marcador y el tejido diana a efectos de una monitorización o control.

El florfenicol, antibiótico objeto de nuestro estudio, puede jugar un papel importante en avicultura por su amplio espectro de actividad antimicrobiana y buena distribución orgánica. Sin embargo, y teniendo en cuenta su relativamente reciente introducción en terapéutica y que su desarrollo se ha enfocado, en un principio, a las especies bovina, porcina y piscicultura, el conocimiento de la farmacocinética y del perfil residual de este agente antimicrobiano en otras especies se hace del todo necesario. Este es el caso de las aves, concretamente pollos parrilleros o broiler, donde existen escasos datos publicados para establecer el tiempo de espera tras la administración de formulaciones a base de florfenicol.

El interés terapéutico de este agente antimicrobiano se basa en tres aspectos fundamentales:

(1) La prohibición del uso del compuesto análogo cloranfenicol en medicina veterinaria para animales productores de alimentos, por el

riesgo potencial que su uso en medicina veterinaria puede tener sobre la Salud Pública.

(2) El creciente aumento de resistencias frente a los antibióticos existentes en el mercado, para el tratamiento de patologías como la colibacilosis en aves <sup>(7)</sup>.

(3) Por último, y como consecuencia de los dos puntos anteriores y de la intensificación de la producción, la elevada prevalencia actual de colibacilosis en avicultura.

En base a lo mencionado, el propósito de este estudio fue determinar las concentraciones tisulares de florfenicol tras su administración oral en pollos parrilleros y así poder establecer el tiempo de retirada (withdrawal) adecuado.

Los tiempos de retirada son patrimonio de cada formulación y no de cada droga. La misma droga, en la misma forma farmacéutica, aplicada por la misma vía de administración, en la misma concentración y dosis, pero formulada en forma diferente, puede tener importantes diferencias en tiempo de retirada. Es por eso que los estudios de residuos deben ser realizados para cada formulación individualmente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Animales experimentales y dosificación:* 30 pollos de 4 semanas de edad fueron alojados en cajas individuales a temperatura ambiente ( $20 \pm 3$  °C) y 60 % de humedad ambiente relativa con acceso ad libitum al agua y alimento, manteniéndose durante una semana en observación antes del inicio del trabajo experimental. Durante ese período de tiempo no se observó en las aves ningún síntoma de enfermedad. Posteriormente al período de adaptación 25 animales experimentales recibieron un tratamiento PO durante 5 días con FLF (Ceflorsol®) a razón de 10 mg/kg de peso conjuntamente con el agua de bebida.

*Obtención de muestras tisulares:* Transcurridos los 5 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados por insensibilización y sangrado a blanco en grupos de 5 individuos a los siguientes tiempos post-administración: 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Los 5 animales no tratados fueron utilizados para obtención de tejidos control (libres de antimicrobianos). Al momento del sacrificio se obtuvieron de cada individuo muestras de hígado, pulmón, grasa/piel, riñón

y músculo, las que fueron almacenadas individualmente a -20° C hasta el análisis.

#### *Análisis de las muestras*

El sistema cromatográfico líquido de alta presión utilizado para el análisis cuantitativo de florfenicol en las muestras tisulares fue un Gilson, equipado con un módulo de bombeo de solventes, modelo 307, autoinyector, modelo 234, detector UV/VISIBLE modelo 155 seteado en 223 nm y horno para columnas cromatográficas ThermasPhere TS-130 a 30°C. Todo el equipo estaba comandado por el software Unipoint. Se utilizó una columna cromatográfica Phenomenex Luna C18 (150 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm) con guarda columna C18. La fase móvil fue metanol:agua (45:55).

*Preparación de las muestras:* Todos los tejidos obtenidos fueron individualmente triturados y mantenidos a -20°C hasta el análisis. Se pesaron alícuotas de cada tejido finamente triturado en tubos de 15 mL, se agregó 0.5 mL de agua a cada tubo y se dejó en reposo a temperatura ambiente. Posteriormente, tras el agregado de acetato de etilo, cada muestra tisular fue homogeneizada con el empleo de un homogeneizador Ultra Turrax T25. Luego, el homogenato fue centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante (S1) obtenido fue trasvasado a un tubo limpio perfectamente rotulado. El procedimiento de extracción se repitió una vez más obteniendo un segundo sobrenadante (S2). La mezcla de ambos sobrenadantes fue evaporada bajo nitrógeno y el residuo seco obtenido se resuspendió en una mezcla de acetonitrilo/ hexano y se evaporó a 45 °C. Este segundo residuo seco se disolvió en fase móvil para inyectar en el sistema cromatográfico.

*Calibración:* Diariamente se preparó por duplicado una batería de diluciones de trabajo (stock) del metabolito en un rango entre 0.5 a 2 µg/ml. Las cuales fueron inyectadas en el HPLC a los efectos de obtener curvas de calibración en las que se obtuvo coeficiente de variación, coeficiente de correlación, medias y desviación estándar de cada concentración. Con los tejidos obtenidos de los animales control (no tratados) se prepararon por duplicado 3 sets de cada tejido a ensayar fortificados con concentraciones conocidas de analito (0.5, 1 y 2 µg/g), los que fueron analizados en el HPLC. Sus concentraciones fueron obtenidas a partir de la curva de

calibración stock. Este procedimiento se repitió en diferentes ocasiones.

El tiempo de espera (withdrawal time, WT) fue estimado por análisis de regresión lineal de las concentraciones logotransformadas de FLF mediante el programa estadístico WT1.4 de la EMEA. La Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (EMEA/MRL/822/02-FINAL) recomendó los siguientes MRLs (Límites Máximos de Residuos permitidos) para tejidos de pollos:

TEJIDO	MRLs
Músculo	0,1 µg/g (100 ng/g)
Piel/Grasa	0,2 µg/g (200 ng/g)
Hígado	2,5 µg/g (2500 ng/g)
Riñón	0,75 µg/g (750 ng/g)

## RESULTADOS

La especificidad del método analítico utilizado fue confirmada por el análisis de las muestras tisulares control, ya que al tiempo de retención del florfenicol no se presentó ninguna interferencia. El porcentaje de recuperación fue de 81 a 110% y la precisión del método expresada por el coeficiente de variación (CV) fue de 1.29 a 11.33%. El límite de cuantificación (LOQ) fue de 67 ng/g para riñón, 200 ng/g para pulmón, 100 ng/g para piel, 99 ng/g para grasa, 75 ng/g para músculo y 230 ng/g para hígado.

El presente estudio demostró que el florfenicol tiene una tendencia a acumularse en los tejidos de los pollos tras su administración oral a razón de 10 mg/kg durante 5 días. Esto puede atribuirse a la capacidad de la molécula de fijarse a las proteínas titulares y en segundo lugar a la reabsorción de la fracción libre desde los túbulos renales. FLF se distribuyó en todos los tejidos alcanzando concentraciones relativamente elevadas y mensurables hasta las 120 h post-administración (Fig.II, Tabla 1). Las mayores concentraciones se encontraron en todos los tejidos analizados a las 24 h post-administración. En piel/grasa y músculo los niveles de florfenicol se mantuvieron por encima del LMR hasta las 120 h al igual que en pulmón, mientras que en hígado ya a las 48 h estaban por debajo del LMR y en riñón a las 72

Tabla 1: Concentraciones tisulares de florfenicol (expresadas en  $\mu\text{g/g}$ ) obtenidas luego de su administración oral conjuntamente con el agua de bebida a razón de 10 mg/Kg durante 5 días. Tiempo de descarte (withdrawal time, WT, expresado en días)

(h)	MUSC	DS	HIGAD	DS	PIEL	DS	GRASA	DS	PULM	DS	RIÑON	DS
24	0.929	0.101	2.810	0.380	2.963	0.478	3.246	1.187	2.276	0.208	3.622	0.680
48	0.684	0.201	1.656	0.209	1.879	0.467	1.697	0.256	1.413	0.165	1.901	0.223
72	0.366	0.052	0.646	0.097	1.152	0.246	1.077	0.187	0.451	0.174	0.685	0.081
96	0.283	0.095	0.363	0.118	0.751	0.087	0.581	0.125	0.234	0.025	0.419	0.081
120	0.184	0.014	0.080	0.031	0.247	0.027	0.248	0.079	0.131	0.022	0.249	0.071
WT (d)	8		2.5		7.2		6.6				4	

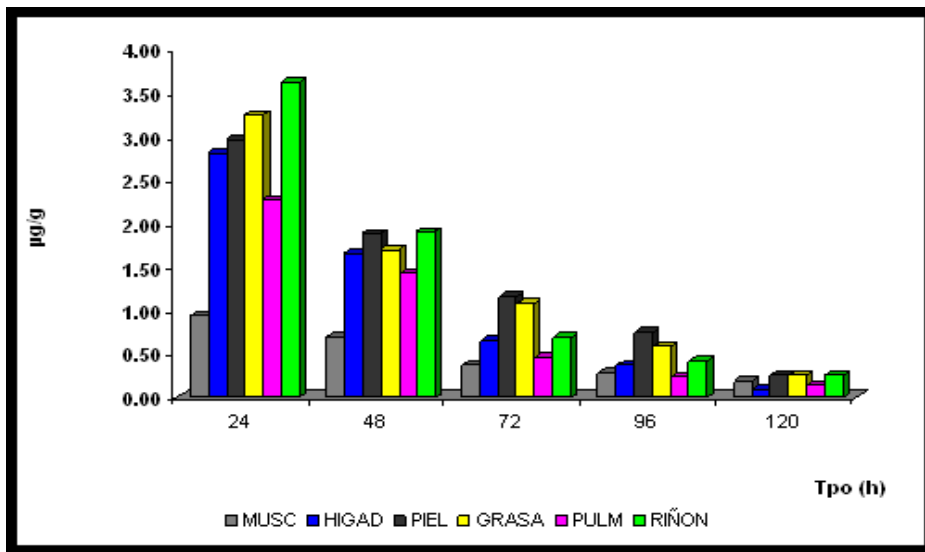


Fig. II: Concentraciones tisulares promedio en función del tiempo luego de la administración de 10 mg/Kg de florfenicol durante 5 días PO.

h cayeron por debajo del LMR recomendado por la EMEA. El WT para consumir estos animales tratados con florfenicol, fue para los diferentes tejidos ensayados de 8 días para músculo, 7.2 d para piel, 6.6 d para grasa, 4 d para riñón y 2.5 d para hígado.

## CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Luego de tratar pollos con FLF por vía oral a razón de 10 mg/kg durante 5 días, se debería considerar un tiempo de espera de 8 días.

El uso de medicamentos veterinarios en animales destinados al consumo humano puede ser origen de residuos en los productos alimenticios obtenidos de estos animales tratados. Los medicamentos veterinarios y los compuestos usados como aditivos en la alimentación ani-

mal, aunque poseen ventajas evidentes para la producción animal, no deben utilizarse sin tener conocimiento de que los productos alimenticios derivados del animal tratado deben responder a las características de calidad y seguridad para el consumidor que marca la normativa en vigor.

Los residuos de estas sustancias pueden afectar la calidad higiénica (tóxicos bióticos y abióticos) y nutritiva (prótidos, lípidos, glúcidos) de los alimentos, así como su aptitud para las transformaciones tecnológicas y las características organolépticas (olor, aroma, color, textura y ternura). Hoy en día, las técnicas analíticas disponibles son capaces de detectar y determinar cuantitativamente concentraciones cada vez más bajas de residuos de compuestos químicos en los alimentos. Como medida de protección para la Salud Pública y en función de los datos

toxicológicos, farmacológicos o microbiológicos se han establecido Límites Máximos de Residuos (LMR) para los fármacos autorizados en medicina veterinaria y en animales productores de alimentos <sup>(2,4,5)</sup>. Los LMR se fijan basándose en la naturaleza y cantidad de residuos que se considere que no constituyen ningún riesgo toxicológico, farmacológico o microbiológico para la salud humana tal como expresa la ingesta diaria admisible (IDA). Se entiende como IDA la cantidad de una sustancia que puede ser ingerida cada día, durante toda la vida, sin riesgo apreciable para el consumidor.

Para el establecimiento del tiempo de retirada o de espera es imprescindible conocer la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción) del principio activo en la especie animal de destino, así como la depleción de sus residuos.

Son numerosos los estudios de farmacocinética de diversos antimicrobianos en especies de mamíferos de animales de abasto (bovinos y porcinos); sin embargo, en relación con los mamíferos se han realizado escasos estudios farmacocinéticos en la especie aviar, como es el caso del florfenicol, compuesto objeto de nuestro estudio. Hoy en día se necesita impulsar el conocimiento farmacocinético y de residuos de diversos agentes terapéuticos de uso en avicultura por motivos de eficacia y seguridad.

Entre los estudios de farmacocinética y residuos de fenicoles en aves, se ha descrito el perfil cinético y de residuos para el cloranfenicol, fenicol de primera generación <sup>(3)</sup>; tianfenicol, integrante de la segunda generación <sup>(9)</sup>; y del florfenicol, la última generación desarrollada <sup>(1, 12, 13)</sup>.

AFIFI y EL-SOUD (1997) demuestran por métodos microbiológicos, que el florfenicol presenta una amplia distribución tisular en pollos broiler. Dosis de 30 mg/kg p.v. de florfenicol originan concentraciones plasmáticas y tisulares eficaces frente a microorganismos patógenos causantes de infecciones aviares, resultados similares a los obtenidos por SHEN *et al.* (2003). En este estudio AFIFI y EL-SOUD (1997) realizan una evaluación de residuos del florfenicol tras la administración vía oral e intramuscular, durante cinco días a una dosis de

30 mg/kg p.v. Obtuvieron muestras tisulares de hígado, corazón, pulmón, bazo, riñón, cerebro, intestino, médula ósea, grasa y músculo, a diferentes tiempos tras el tratamiento hasta las 96 horas. La cuantificación del florfenicol en estos tejidos se hizo por métodos microbiológicos, utilizando el *Bacillus subtilis*. A las 48 horas de la última dosis oral, solo se evidenció la presencia de florfenicol en riñón ( $0,03 \pm 0,001 \mu\text{g/g}$ ) y en pulmón ( $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ ). Tras administración intramuscular se detectó la presencia de florfenicol en hígado ( $0,01 \pm 0,001 \mu\text{g/g}$ ), en corazón ( $0,03 \pm 0,003 \mu\text{g/g}$ ), en pulmón ( $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$ ), en bazo ( $0,03 \pm 0,003 \mu\text{g/g}$ ) y en riñón ( $0,08 \pm 0,008 \mu\text{g/g}$ ). Basándose en estos resultados, proponen un tiempo de espera o de retirada de, al menos, 4 días (AFIFI y EL-SOUD, 1997). Estos menores valores a pesar de utilizar una dosificación 3 veces mayor, lógicamente tienen su explicación en la diferente metodología analítica empleada.

El florfenicol está incluido en el Anexo I para las especies bovina, porcina, aves y peces. En el caso de las aves, no se autoriza su uso en ponedoras cuyos huevos vayan destinados al consumo humano. La IDA microbiológica, establecida por el Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) es  $3 \mu\text{g/kg}$ , es decir  $180 \mu\text{g}$  por persona, y la IDA toxicológica es  $10 \mu\text{g/kg}$ , es decir,  $600 \mu\text{g}$  por persona (tomando para el hombre  $60 \text{ kg}$  de peso corporal)<sup>(6)</sup>.

La metodología seguida en el presente trabajo puede tomarse como referencia de los estudios de residuos que deberían realizarse para todas las formulaciones veterinarias que se utilizan en animales que serán destinados al consumo humano.

## REFERENCIAS

1. Afifi, N.A. and El-Soud, K.A. (1997). Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *British Poultry Science* 38, 425-428.
2. Anadón, A. and Martínez-Larrañaga, M.R. (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science* 59, 183-198.
3. Anadón, A., Bringas, P., Martínez-Larrañaga, M.R. and Díaz, M.J. (1994). Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and*

Therapeutics 17, 52-58.

4. Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R. y Martínez, M.A. (1999a). Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal (I). Industria Farmacéutica, Enero/Febrero.

5. Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R. y Martínez, M.A. (1999b). Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal (II). Industria Farmacéutica, Marzo/Abril.

6. EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA) (2002). Florfenicol (Extension to all food producing species). Summary Report. EMA/MRL/822/02-FINAL. January 2002.

7. Mellata, M., Jacquemin, E., Bakour, R. And Mainil, J. (1998). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains of bovine and avian origin isolated in Algeria. *Annales de Médecine Vétérinaire* 142(2), 129-138.

8. Mestorino N, Pesoa J, Turic E, Errecalde J. (1999) Florfenicol: Aspectos Farmacológicos. *Veterinaria Argentina*, vol XVI (152): 127-139.

9. NAGATA, T. and SAEKI, M. (1991). Determination of thiamphenicol residues in chicken muscles by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 565(1-2), 471-476.

10. Neu, H.C. & Fu, K.P. (1980) In vitro activity of chloramphenicol and thiamphenicol analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 18, 311-316.

11. Schafer, T.W.; Moss, E.L.; Nagabhushan, T.L. and Miller, G.H. (1980). Novel fluorine-containing analogs of chloramphenicol and thiamphenicol: Antibacterial and biological properties, p.444-446. In: J.D. Nelson and C. Grassi (de), *Current Chemotherapy and Infectious Disease*, Vol. 1. Am. Soc. Microbiology, Washington D.C.

12. Shen, J., Hu, D., Wu, X. and Coats, J.R. (2003). Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics* 26, 337-341.

13. Switala, M., Okoniewski, P., Smutkiewicz, A. and Jaworski, K. (2003). Pharmacokinetics of florfenicol in turkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26 (Suppl. 1), 116.

14. Syriopoulou, V.P.; Harding, A.L.; Goldmann, D.A. and Smith, A.L. (1981). In vitro antibacterial activity of fluorinated analogs of chloramphenicol and thiamphenicol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 19, 294-297.

15. Yunis, A.A. (1981). Chloramphenicol toxicity and the role of the p-NO<sub>2</sub> in aplastic anemia. In *Safety Problems Related to Chloramphenicol and Thiamphenicol Therapy*. Ed. Najean, J. et al., pp 17-30. Raven