

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



**BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE UN
DERIVADO FLUORADO DEL TIANFENICOL EN
POLLOS BROILER**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Alba Ríos Insua

Bajo la dirección de los Doctores:

María Rosa Martínez-Larrañaga
Arturo Anadón Navarro

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2688-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO
DE UN DERIVADO FLUORADO DE
TIANFENICOL EN POLLOS BROILER**

TESIS DOCTORAL

ALBA RÍOS INSUA

MADRID 2004

ALBA RÍOS INSUA

**BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO
DE UN DERIVADO FLUORADO DE
TIANFENICOL EN POLLOS BROILER**

Directores:

**Prof. Dra. María Rosa Martínez-Larrañaga
Catedrática de Toxicología y Legislación Sanitaria
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid**

**Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro
Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Dedicada a mis padres:

**M^a Jesús Insua Negroao
Sixto Ríos García**

AGRADECIMIENTOS

Una vez terminada la tesis, pienso en las numerosas personas que me gustaría se sintieran orgullosas y complacidas de haber participado de alguna manera en esta memoria. Espero que, aunque muchas no sean nombradas, no duden en absoluto de mi reconocimiento y deuda.

Quiero expresar mi agradecimiento a:

A la Prof. Dra. María Rosa Martínez-Larrañaga y al Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro, por las enseñanzas y formación que me han transmitido, así como los consejos y dedicación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral, por todo su apoyo.

A mis compañeras del equipo de Investigación de la Cátedra de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid: Dra. María Teresa Frejó Moya, Dra. Margarita Lobo Alonso y Dra. Arantxa Martínez-Caballero, y muy especialmente a la Dra. María Jesús Díaz Plaza, por su colaboración en este trabajo.

A la Dra. Pilar Bringas de la Lastra, Directora-Técnica responsable del animalario de la UCM, y a D. José García Muñoz del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, por su valiosa ayuda en el cuidado y manejo de los animales utilizados en el presente trabajo.

A Schering-Plough Corporation, en especial al Dr. K.J. Varma, D. Hubert Trentesaux y D. Enrique Calvo López por facilitar el desarrollo de este proyecto.

A mis hermanos M^a Jesús, Sixto, Valeria y David Ríos Insua por su apoyo y confianza, y muy especialmente a mi hermana Cristina Ríos Insua.

A mi esposo Rafael Hernández López y mi hija Andrea por darme la fuerza para llevar a cabo este proyecto y tantos otros.

A D^a M^a del Mar Vázquez, D^a M^a Isabel Díaz Alonso, D^a Irene Trigueros Apraiz, Dra. M^a Luisa Fernández Cruz, Dra. Ana Fresno Ruíz, Dr. Justo Nombela Maqueda, D. Antonio Fernández y García, y a todas esas personas que en ese tiempo me han alentado a conseguir mi objetivo y me han brindado su apoyo y amistad.

Este trabajo de investigación ha sido parcialmente financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Proyecto Ref^a SAF 96-0044.

ÍNDICE

ÍNDICE

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	<u>Página</u>
1.1. Fenicoles. Origen y características químicas	1
1.1.1. Cloranfenicol	2
1.1.2. Tianfenicol	5
1.1.3. Florfenicol	6
1.2. Mecanismo de acción de los fenicoles	10
1.3. Actividad antimicrobiana de los fenicoles	15
1.3.1. Cloranfenicol	27
1.3.2. Tianfenicol	32
1.3.3. Florfenicol	33
1.4. Resistencias de los fenicoles	41
1.4.1. Cloranfenicol y Tianfenicol	41
1.4.2. Florfenicol	47
1.5. Indicaciones clínicas	51
1.5.1. Cloranfenicol y Tianfenicol	51
1.5.2. Florfenicol	55
1.6. Toxicidad de los fenicoles	63
1.6.1. Cloranfenicol	63
1.6.2. Tianfenicol	69
1.6.3. Florfenicol	71
1.7. Interacciones medicamentosas de los fenicoles	84
1.7.1. Cloranfenicol	84
1.7.2. Tianfenicol	86
1.7.3. Florfenicol	88
1.8. Farmacocinética del florfenicol	89
1.9. Residuos de florfenicol en productos animales	118
1.10. Objetivos del trabajo	126
<u>2. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	130

2.1. Protocolo y diseño experimental	131
2.2. Ensayo analítico de florfenicol y sus metabolitos en plasma y tejidos	134
2.3. Procedimiento de extracción y condiciones cromatográficas	137
2.4. Análisis de datos	141
2.5. Reactivos y fármacos	150
3. <u>RESULTADOS</u>	152
3.1. Farmacocinética de florfenicol tras administración intravenosa	153
3.1.1. Niveles plasmáticos de florfenicol tras administración intravenosa	153
3.1.2. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol tras administración intravenosa	153
3.2. Farmacocinética de florfenicol y su metabolito florfenicol amina tras administración oral de florfenicol	160
3.2.1. Concentraciones plasmáticas de florfenicol y su metabolito florfenicol amina tras administración oral	160
3.2.2. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol y su metabolito florfenicol amina tras administración oral	164
3.3. Distribución y depleción tisular de florfenicol y su metabolito florfenicol amina tras administración oral de florfenicol	176
4. <u>DISCUSIÓN</u>	205
5. <u>CONCLUSIONES</u>	217
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	224

1. INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

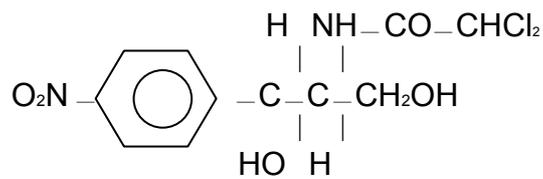
1.1. Fenicoles. Origen y características químicas

La denominación de fenicoles incluye tres fármacos, el cloranfenicol, el tianfenicol y el florfenicol, derivados del ácido dicloroacético. El cloranfenicol posee un grupo nitro en posición *para* del anillo bencénico; este grupo es sustituido por otro sulfometil en el tianfenicol; finalmente, manteniendo el grupo sulfometil en posición *para* del anillo bencénico pero introduciendo un átomo de flúor en la función del alcohol primario terminal en el tianfenicol, surge el florfenicol (FIGURA 1).

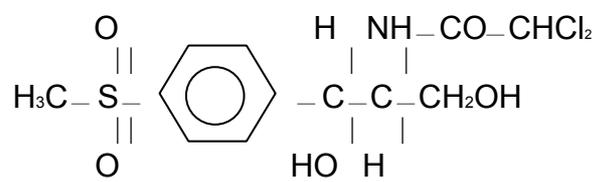
Los tres antibióticos: cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol, en la actualidad se obtienen por síntesis química. Forman una familia de compuestos antimicrobianos sintéticos de gran utilidad en el tratamiento de infecciones bacterianas. Caracterizados por su amplio espectro de acción y buena distribución orgánica, cada uno de ellos ha tenido una evolución muy particular en lo que a su uso terapéutico se refiere a lo largo del tiempo.

1.1.1. Cloranfenicol

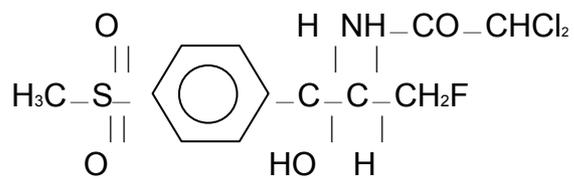
La primera generación de estos tres antibióticos, el cloranfenicol, se aisló



Cloranfenicol



Tianfenicol



Florfenicol

FIGURA 1. Estructura química de los fenicoles: cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol.

originariamente de filtrados de cultivos del hongo *Streptomyces venezuelae* por ERLICH *et al.* (1947).

En 1948 se comenzó a sintetizar de forma industrial para su uso en clínica. Se llevó a cabo un amplio número de ensayos clínicos por parte de la compañía farmacéutica Parke Davis, que obtuvo, en 1949, la primera autorización de comercialización para diversas indicaciones dentro del ámbito de la medicina humana (BORIES, 1994). El cloranfenicol se situó rápidamente como un compuesto primordial en la terapéutica debido a sus propiedades físico-químicas, como son ser un compuesto altamente liposoluble (soluble en solventes polares), molécula neutra no-ionizada y tener una elevada capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Fue el primer compuesto antimicrobiano de amplio espectro de actividad frente a importantes bacterias aerobias y anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas, *Rickettsia* y *Chlamydia*, incluso frente a aquellas resistentes a otros agentes antimicrobianos. A estas propiedades se sumaron otras como son ser administrable por vía oral, su eficaz penetración en los compartimentos corporales, un bajo coste y en un principio, una aparente seguridad.

El cloranfenicol es un compuesto químico estable, derivado del ácido dicloroacético que contiene un núcleo nitrobencénico. La FIGURA 1, muestra su fórmula estructural que corresponde a la 2,2-dicloro-N-[-hidroxi-1-(hidroximetil)-2-(4-nitrofenil)etil] acetamida. Posee una configuración D-treo, que es el único isómero activo: D(-)-treo-2-dicloroacetamido-1-*p*-nitrofenil-1,3-

propanediol ó D-treo-N-(1,1'-dihidroxi-1-*p*-nitrofenil-isopropil)dicloroaceta-mida.

El cloranfenicol cuya fórmula empírica es $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$, posee un peso molecular de 323,14. Es una molécula neutra, muy soluble en metanol, etanol, butanol, etilacetato y acetona. Posee una solubilidad media en éter y es insoluble en benceno y aceites vegetales.

Presenta un sabor amargo, por ello en su administración oral, además de utilizarse su base libre, se utiliza esterificado en forma de palmitato (éster de palmitato), profármaco inactivo que enmascara su sabor. Para su administración parenteral se utiliza su sal succinato (monosuccinato sódico), éster hidrosoluble.

1.1.2. Tianfenicol

Es éste un análogo estructural del cloranfenicol y, por tanto, un compuesto químico estable, derivado del ácido dicloroacético que contiene un núcleo nitrobencénico. La FIGURA 1 muestra su fórmula estructural. La molécula de tianfenicol se modifica respecto a la de cloranfenicol en su anillo aromático (nitrobencénico), sustituyendo el grupo *p*-nitro de la molécula del cloranfenicol, por un grupo *p*-sulfometilo, adquiriendo, en consecuencia, menos efectos toxicológicos que comentaremos en capítulos posteriores.

El tianfenicol ó D-treo-2,2-dicloro-N-[β -hidroxi- α -(hidroximetil)-*p*-(sulfometil)

fenetil]acetamida ó D-d-treo-2-dicloroacetamido-1-(4-sulfometil)-fenil-1,3-propanodiol, con fórmula empírica $C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$, posee un peso molecular de 356,23.

Este compuesto es soluble en agua y en alcohol. Comparativamente con el cloranfenicol posee diferencias farmacológicas y toxicológicas, siendo más estable en solución, posee una menor unión a proteínas y no sufre una biotransformación tan amplia (AZZOLINI *et al.*, 1970). Difunde tanto a espacios intracelulares como al sistema nervioso central y al humor acuoso (HUBER, 1965), como sucede con el cloranfenicol.

1.1.3. Florfenicol

El florfenicol es un compuesto antimicrobiano sintético, derivado fluorado del tianfenicol y del cloranfenicol, con un perfil farmacológico similar al de ambos compuestos. Fue sintetizado y desarrollado en el año 1980 por Nagabhushan y un grupo de investigadores de Schering-Plough Corporation, en su Instituto de Investigación (NAGABHUSHAN *et al.*, 1980).

Posee un tamaño molecular y una estructura similares a los otros dos compuestos antimicrobianos anteriores, el tianfenicol y el cloranfenicol. Su fórmula estructural (FIGURA 1) es: [R-(R*,S*)-2,2-Dicloro-N-[1-(fluorometil)-2-hidroxi-2-[4-sulfometilo)fenil]etil] acetamida, ó D-(treo)-1-p-fenilsulfometilo-2-amino-3-fluoro-1-propanol. El florfenicol con una fórmula empírica:

$C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$, posee un peso molecular de 358,21 y no contiene grupos ácidos o básicos funcionales.

Difiere del D(-)treo cloranfenicol en dos puntos fundamentales. En primer lugar, contiene un grupo p-sulfometilo en lugar del grupo p-nitro del cloranfenicol. En segundo lugar, contiene un átomo de flúor no susceptible de acetilación sustituyendo al grupo hidroxilo en la función de alcohol primario terminal del cloranfenicol. Posee, por tanto, una gran similitud estructural con el tianfenicol, con una única sustitución respecto a éste, siendo por ello, 3-fluoro-3-desoxi-tianfenicol.

Ambas diferencias estructurales conllevan distintas características físicas respecto al cloranfenicol (solubilidad, hidrofobicidad), en sus reacciones químicas (pérdida de reactividad en los correspondientes grupos funcionales), y diferencias biológicas (farmacocinética y actividad antimicrobiana), confiriendo a esta molécula, como veremos en el capítulo correspondiente, ventajas sobre el cloranfenicol y el tianfenicol, en lo que a seguridad y eficacia se refiere.

Los requerimientos generales para la actividad antimicrobiana del cloranfenicol y su análogo tianfenicol incluyen: (1) poseer una configuración D-treo, (2) contener en su molécula 1,3-propanodiol y (3) presencia de un grupo captador de electrones en el anillo aromático.

La búsqueda de análogos del cloranfenicol que no estuvieran asociados al desarrollo de discrasias sanguíneas, como la anemia aplásica, efecto secundario grave inherente a la utilización de cloranfenicol, y que, además, fueran activos frente a microorganismos cloranfenicol/tianfenicol-resistentes, pero que mantuvieran sus excelentes características farmacocinéticas, llevó a la síntesis del florfenicol. En una fase inicial, se comprobó que la molécula 1,3-propanodiol podía ser alterada (en este caso con un átomo de flúor en el lugar del grupo hidroxilo), sin pérdida de actividad antimicrobiana.

Durante su desarrollo posterior, se comprobó que, a pesar de la modificación en la molécula 1,3-propanodiol, era indispensable mantener los otros dos requerimientos generales, así: la configuración D-treo por un lado, y la presencia de un grupo captador de electrones (como un grupo nitro o sulfometilo) en el anillo aromático por otro. Se observó que otros análogos con moléculas metilsulfóxido o metiltio resultaban prácticamente inactivas (SYRIOPOULOU *et al.*, 1981).

El florfenicol es una molécula neutra, que carece de grupos funcionales ionizables en rangos de pH entre 3 y 9. Soluble en solventes orgánicos polares (altamente soluble en acetona, medianamente soluble en etanol) y ligeramente soluble en agua. Posee una relativamente elevada solubilidad lipídica, un coeficiente de partición octanol/agua de 2,36, demostrado por su amplia distribución tisular. Es un principio activo no hidratado y no higroscópico, estable a la luz, al calor y a la humedad.

1.2. Mecanismo de acción de los fenicoles

El mecanismo de acción es idéntico para los tres antibióticos: cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol. Las primeras investigaciones con el cloranfenicol señalaron que su mecanismo de acción se basa en una potente, aunque reversible, inhibición de la biosíntesis de proteínas en los microorganismos (WEISBLUM y DAVIES, 1968), actuando sobre el centro peptidil-transferasa del ribosoma bacteriano (FERNANDEZ-MUÑOZ *et al.*, 1971).

Para llevar a cabo la inhibición de la síntesis bacteriana, los tres análogos estructurales, penetran en el interior de la célula bacteriana, atravesando la membrana de la bacteria mediante difusión facilitada. Los fenicoles actúan en primera instancia, uniéndose de forma reversible a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (próximo al lugar de interacción de los macrólidos y clindamicina, compuestos con los que se produce una inhibición competitiva).

De este modo, y aunque aparentemente no hay alteración de la unión del ARN de transferencia en el codon de reconocimiento de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, los fenicoles, parecen impedir la unión aminoacil del ARN de transferencia al lugar de unión de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (KAPUSNIK-UNER *et al.*, 1996).

La consecuencia de esto es la ausencia de interacción entre la peptidiltransferasa y su sustrato aminoacídico, impidiéndose así la formación

del enlace peptídico (PESTKA, 1971), y, por tanto, la síntesis proteica de los microorganismos. La FIGURA 2 representa un diagrama del ribosoma bacteriano que puede ayudar a una mejor comprensión de este mecanismo de acción (KAPUSNIK-UNER *et al.*, 1996).

Así, para la iniciación del proceso, se produce una asociación de las subunidades del ribosoma bacteriano 30S y 50S, para formar la 70S. El ARN mensajero (ARNm) se une a la subunidad 30s del ribosoma bacteriano. El lugar P (peptídico) de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano incluye la cadena polipeptídica en formación; generalmente, durante la fase de elongación, van entrando nuevos ARNt que portan en su lugar aminoacilo los siguientes aminoácidos (aa) que se unirán a la cadena, según la secuencia específica de los sucesivos codones del ARNm.

Durante la elongación, el ARNm se mueve sobre el ribosoma al lugar A (aminoacilo), al tiempo que los aminoácidos codificados por la secuencia de sus bases se van ensamblando para producir el polipéptido. Una vez ocupados los dos lugares, peptídico y aminoacilo, se produce el enlace peptídico. Este sobreviene por ataque del grupo nucleofílico del grupo amino del ARNt-aminoacilo entrante, en el lugar aminoacilo, sobre el carbono del grupo carboxílico esterificado situado en el lugar peptídico. Este mecanismo

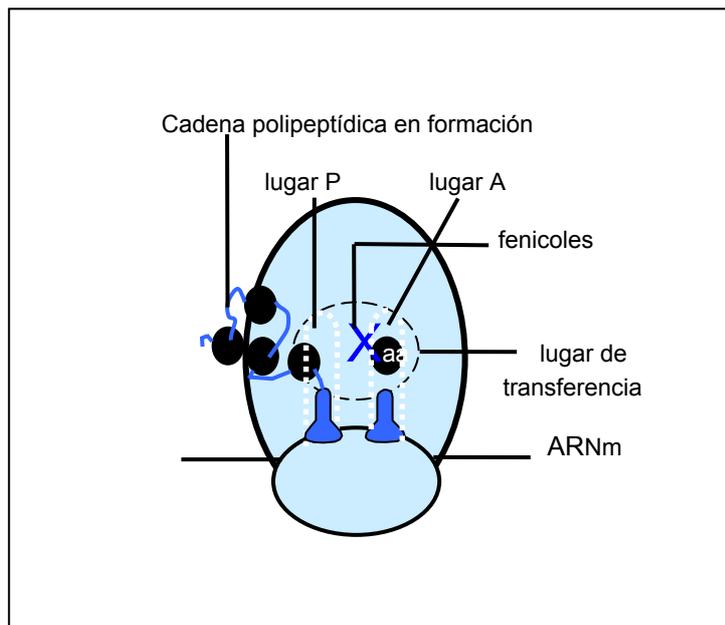
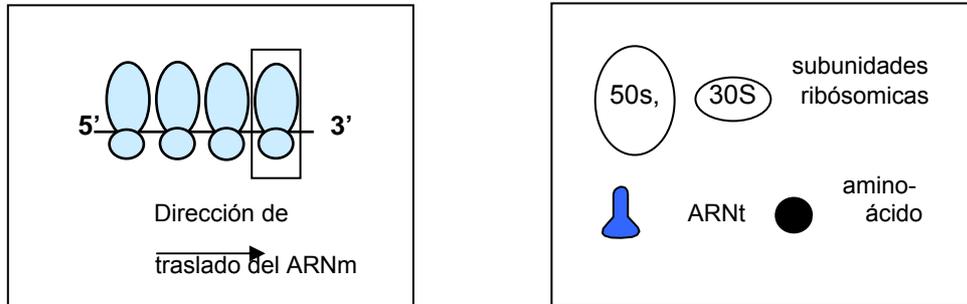


FIGURA 2. Mecanismo de inhibición de la síntesis de proteína bacteriana por los fenicolas.

está catalizado por el enzima peptidil-transferasa, que es un componente de la subunidad 50s (proteína ribosómica L16).

Tras el enlace, el polipéptido en formación pasa al lugar aminoacilo y queda un ARNt descargado en el lugar peptídico. El ribosoma se desplaza en una extensión de un codon del ARNm, al tiempo que el ARNt-peptidil pasa del lugar aminoacilo al peptídico, quedando libre el lugar aminoacilo.

Finalmente, la terminación de la síntesis proteica se basa en la hidrólisis del ARNt-peptídico, así como el último ARNt y el ARNm, y se disocian las dos subunidades del ribosoma bacteriano 50S y 30S. Posteriormente, sobre la cadena peptídica formada, se producen diversas modificaciones (metilaciones, hidroxilaciones, etc.) para inducir la forma biológicamente activa del polipéptido (CLARK, 1980).

Los tres análogos estructurales que nos ocupan, cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol, actúan sobre las células procariotas, y, en menor medida, también actúan sobre las células eucariotas. Así, la peptidiltransferasa de los ribosomas mitocondriales bovinos (70S), a diferencia de aquella de los ribosomas citoplásmicos (80S), es sensible a la acción inhibitoria del cloranfenicol.

En concreto, el cloranfenicol actúa sobre la línea roja de mamíferos (médula ósea) (YUNIS y BLOOMBERG, 1964), debido al proceso metabólico que sigue su grupo *p*-nitro en el hígado, o por la acción de la flora del tracto

gastrointestinal, formándose un derivado nitroso que reacciona fuertemente con el ADN, desencadenando una aplasia medular, principal consecuencia toxicológica derivada del uso de cloranfenicol (YUNIS, 1988; ROSENKRANZ, 1988). Así pues, su aplicación terapéutica, da lugar a una serie de alteraciones hemáticas, de las que hablaremos con mayor detalle en el capítulo correspondiente a toxicidad.

El florfenicol, del mismo modo que el tianfenicol, solo provoca esta inhibición de la síntesis de proteína mitocondrial tras su administración a dosis elevadas y esto se debe a la acción de su metabolito ácido oxámico sobre el ADN mitocondrial. Sin embargo, y a diferencia de las alteraciones producidas por el cloranfenicol, esta es una discrasia sanguínea dosis-dependiente y transitoria.

Los tres fenicoles actúan sobre la línea mieloide de mamíferos (PAAPE y MILLER, 1990), provocando una alteración de la morfología de los neutrófilos y neutropenia, que parecen deberse a la acción depresora de los tres compuestos sobre la flora digestiva de los animales y la medioambiental, disminuyendo así la estimulación de sus sistemas de defensa. Este hallazgo no parece tener una consecuencia clínica importante.

1.3. Actividad antimicrobiana de los fenicoles

Los fenicoles inhiben la síntesis de proteínas (WEISBLUM y DAVIES, 1968), actuando sobre el centro peptidil-transferasa del ribosoma bacteriano, (KAPUSNIK-UNER *et al.*, 1996). La consecuencia es la ausencia de formación del enlace peptídico, y, por tanto, de la síntesis proteica. Con este mecanismo de acción se puede esperar un amplio espectro de actividad antimicrobiana.

La actividad *in vitro*, que nos permitirá la elección de la sustancia más apropiada para una determinada patología, está basada en dos pruebas. Un método cualitativo, el método de difusión en agar con discos o método Kirby-Bauer, que es únicamente un indicador de sensibilidad / resistencia; y un método cuantitativo *in vitro*, la prueba de las diluciones o determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del fármaco frente a diversos microorganismos. Esta prueba se realiza mediante diferentes diluciones en caldo de cultivo y un inóculo de 10^4 a 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC). Las diferencias en CMI para el 90% de las cepas investigadas (CMI_{90}) se consideran como un indicativo de la diferencia en la susceptibilidad (es decir, la actividad o potencia de los fármacos antimicrobianos estudiados *in vitro*).

La CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) dan un elevado valor orientativo, clasificándose la sensibilidad de un germen frente a un antimicrobiano en función de su CMI. El objetivo primario de la terapéutica

antimicrobiana es conseguir concentraciones corporales del antibiótico superiores a las CMI de las especies causantes del proceso infeccioso.

La CMI es la menor concentración de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo tras 18-24 horas de incubación. Del mismo modo, la CMB es la menor concentración capaz de destruir o matar 10^5 bacterias en 1 ml de cultivo tras 18-24 horas de incubación.

Por otro lado, tomando en consideración la velocidad de la muerte celular *in vitro* y la influencia de la concentración del antimicrobiano, se pueden establecer dos grandes grupos:

- i) Los antibióticos concentración-dependientes, donde la velocidad de la acción bactericida aumenta con la concentración. Estos antibióticos presentan a menudo una gran velocidad de acción bactericida.
- ii) Los antibióticos tiempo-dependientes, para los cuales el efecto bactericida alcanza desde la CMI un máximo de intensidad. Los fenicoles pertenecen a este grupo.

En la TABLA 1 se muestra la actividad antimicrobiana de los fenicoles (NEU y FU, 1980) comparada con la obtenida por otros autores (CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS, *et al.* 1988; GOLSTEIN y CITRON, 1988) con otros compuestos antimicrobianos frente a diferentes especies de microorganismos aislados del hombre.

Así podemos observar la eficacia de florfenicol frente a *Bacteroides* spp., con una CMI₉₀ de 3,1 µg/ml en comparación con los 16 µg/ml de tetraciclina o los 128 µg/ml de cefoxitina. También se constata una superior eficacia del florfenicol frente a *Staphylococcus aureus*, con una CMI₉₀ de 6,3 µg/ml en comparación con los 256 µg/ml de cefotaxima o los 50 µg/ml de gentamicina. Del mismo modo, en el caso de *Haemophilus influenzae* se observa una mayor eficacia de florfenicol, con una CMI₉₀ de 0,8 µg/ml en comparación con los 25 µg/ml de amoxicilina.

TABLA 1. Actividad antimicrobiana *in vitro* de los fenicoles comparada con otros antimicrobianos frente a especies de microorganismos aislados del hombre.

<u>MICROORGANISMO</u>	ANTIMICROBIANO	CMI ₉₀ (µg/ml)	REFERENCIAS
<u>Gérmenes Anaerobios</u>			
<i>Bacteroides</i> spp	Cloranfenicol	25	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	25	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	3,1	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	>128	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Penicilina G	8	GOLDSTEIN y CITRON, 1988
	Ampicilina	8	GOLDSTEIN y CITRON, 1988
	Amoxicilina	0,5	GOLDSTEIN y CITRON, 1988
	Cefoxitina	>128	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Tetraciclina	16	GOLDSTEIN y CITRON, 1988
<u>Gérmenes Anaerobios Facultativo Gram-positivos</u>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cloranfenicol	50	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	6,3	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	1	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Penicilina G	8	GOLDSTEIN y CITRON, 1988
	Ampicilina	4	GOLDSTEIN y CITRON, 1988
	Amoxicilina	1	GOLDSTEIN y CITRON, 1988
	Cefotaxima	256	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> , 1988
	Gentamicina	50	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> , 1988
Tetraciclina	32	GOLDSTEIN y CITRON, 1988	

CONTINUACIÓN TABLA 1.

MICROORGANISMO	ANTIMICROBIANO	CMI ₉₀ (µg/ml)	REFERENCIAS
Gérmenes Anaerobios Facultativos Gram-negativos			
<i>Enterobacter</i> spp	Cloranfenicol	200	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	200	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	200	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	0,4	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Ampicilina	>1024	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Cefotaxima	128	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Gentamicina	16	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
<i>Escherichia coli</i>	Cloranfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	25	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	0,25	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Ampicilina	>1024	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Amoxicilina	>100	CHIN y NEU, 1984
	Cefotaxima	2	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
<i>Klebsiella</i> spp	Gentamicina	>8	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Cloranfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	100	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	0,25	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Cefotaxima	>128	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Gentamicina	128	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
<i>Haemophilus</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Cloranfenicol	1,6	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	25	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	0,8	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	0,015	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Ampicilina	16	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Amoxicilina	25	CHIN y NEU, 1984
	Cefotaxima	≤ 0,1	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988

CONTINUACIÓN TABLA 1.

MICROORGANISMO	ANTIMICROBIANO	CMl ₉₀ (µg/ml)	REFERENCIAS
Gérmenes Aerobios Gram-negativos			
<i>Proteus mirabilis</i>	Cloranfenicol	25	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	12,5	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	0,2	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Cefotaxima	0,5	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Gentamicina	>128	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
<i>Providencia spp</i>	Cloranfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	50	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	3,12	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Cefotaxima	1	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Gentamicina	4	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
<i>Salmonella spp</i>	Cloranfenicol	100	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	6,3	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	0,3	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Cefotaxima	0,5	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Amoxicilina	>100	CHIN y NEU, 1984
	Ampicilina	>128	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
<i>Shigella spp</i>	Cloranfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	6,3	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	0,25	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Ampicilina	>128	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Cefotaxima	0,25	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Gentamicina	1	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988

CONTINUACIÓN TABLA 1.

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>ANTIMICROBIANO</u>	<u>CMI₉₀</u> <u>(µg/ml)</u>	<u>REFERENCIAS</u>
Gérmenes Aerobios Gram-negativos			
<i>Neisseria</i> spp	Cloranfenicol	6,3	NEU y Fu, 1980
	Tianfenicol	12,5	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	3,1	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	0,015	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Cefotaxima	0,06	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
<i>Pseudomonaceae</i>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cloranfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Tianfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Florfenicol	>200	NEU y FU, 1980
	Ciprofloxacina	1	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Cefotaxima	>128	CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988
	Gentamicina	64	CHIN y NEU, 1984; CAMPOLI-RICHARDS <i>et al.</i> 1988

Las primeras publicaciones referentes a la actividad *in vitro* de diversos análogos fluorados del cloranfenicol y del tianfenicol se realizaron en los años 1980 y 1981 (NEU y KWUNG, 1980; SYRIOPOULOU *et al.*, 1981). En ellas se demuestra una superior actividad *in vitro* frente a microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos de origen fundamentalmente humano de diversos análogos fluorados del cloranfenicol y tianfenicol (encontrándose entre ellos el florfenicol). Esta superioridad consiste en una diferencia significativa de sus valores de CMI. Además, el florfenicol es eficaz frente a bacterias resistentes al cloranfenicol, especialmente enterobacterias de la especie humana (TABLA 2), así como frente a otras cepas resistentes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus*. Las resistencias al cloranfenicol se deben a la producción de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) por parte de las bacterias. Codificada por plásmidos, este enzima reacciona con el grupo hidroxilo del alcohol primario del cloranfenicol. Con la sustitución en la molécula de florfenicol de este grupo hidroxilo por un átomo de flúor no acetilable, esta reacción de acetilación queda impedida, no permitiéndose la actuación de la mencionada enzima.

Así, según NEU y KWUNG (1980), el florfenicol actúa como un compuesto de mayor actividad que el cloranfenicol y el tianfenicol frente a un amplio rango de bacterias (TABLA 2), con un 90% de los aislados inhibidos a concentraciones de entre 3,1 y 6,3 µg de florfenicol por ml. Este mismo estudio demostró que el florfenicol inhibía el 20% de los aislados resistentes al cloranfenicol (CMI_≥25 µg/ml). El florfenicol inhibió todos los enterococos a dosis de 12,5 µg/ml, frente

al 80% que inhibía el cloranfenicol. La especie *Haemophilus influenzae* fue sensible a los tres compuestos. Sin embargo, el florfenicol fue dos veces más activo que el cloranfenicol; y ocurría lo mismo en el caso de las cepas de *Neisseria*.

En el mismo estudio, para microorganismos como *Salmonella* spp., el rango de valores de CMI del cloranfenicol era de 3,1 a 200 $\mu\text{g/ml}$, siendo el porcentaje de inhibición a la concentración 12,5 $\mu\text{g/ml}$ del 78%. Para este mismo microorganismo, el rango de valores de CMI del florfenicol era de 3,1 a 12,5 $\mu\text{g/ml}$ con un porcentaje de inhibición a 12,5 $\mu\text{g/ml}$ del 100%. En el caso de *Shigella* spp., el rango de valores de CMI del cloranfenicol es de 0,8 a 200 $\mu\text{g/ml}$, siendo el porcentaje de inhibición a la concentración 12,5 $\mu\text{g/ml}$ del 88%. Para este mismo microorganismo, el rango de valores de CMI del florfenicol es de 0,8 a 6,3 $\mu\text{g/ml}$ con un porcentaje de inhibición a 12,5 $\mu\text{g/ml}$ del 100% (NEU y KWUNG, 1980).

TABLA 2. Actividad comparada de cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol frente a microorganismos entéricos (NEU y KWUNG, 1980).

Microorganismo (a)	Antibiótico	Rango (µg/ml)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	% Inhibición a 12,5 µg/ml
<i>E. coli</i> (51)	CF	3,1->200	6,3	>200	74
	TF	1,6->200	100	>200	2
	FF	3,1->200	12,5	25	66
<i>Klebsiella</i> (35)	CF	0,4->200	3,1	>200	61
	TF	6,3->200	3,1	>200	6
	FF	0,8->200	6,3	100	83
<i>Enterobacter</i> (10)	CF	3,1->200	6,3	200	80
	TF	50->00	100	200	0
	FF	3,1->200	12,5	200	80
<i>Citrobacter</i> (16)	CF	3,1->200	6,3	100	75
	TF	12,5->200	100	>200	6
	FF	6,3-100	12,5	25	75
<i>Proteus mirabilis</i> (13)	CF	12,5-25	25	25	38
	TF	12,5->200	200	>200	0
	FF	6,3-12,5	6,3	12,5	100
<i>Proteus indol</i> Positivo (32)	CF	6,3->200	112,5	100	59
	TF	6,3->200	50	>200	22
	FF	3,1-25	3,1	12,5	92
<i>Serratia</i> (16)	CF	>200			0
	TF	>200			0
	FF	>200			0

<i>Shigella</i> (32)	CF	0,8->200	3,1	>200	88
	TF	0,8->200	3,1	>200	78
	FF	0,8-6,3	6,3	6,3	100
<i>Salmonella</i> (32)	CF	3,1->200	6,3	100	78
	TF	25->200	50	>200	0
	FF	3,1-12,5	6,3	6,3	100
<i>Providencia</i> (28)	CF	12,5->200	50	>200	4
	TF	6,3->200	>200	>200	28
	FF	3,1-100	12,5	50	68
<i>Acinetobacter</i> (13)	CF	3,1->200	50	>200	23
	TF	100->200	100	>200	0
	FF	3,1->200	>200	>200	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10)	CF	12,5->200	>200	>200	
	TF	50->200	>200	>200	
	FF	12,5->200	>200	>200	
<i>Bacteroides</i> (51)	CF	3,1-50	6,3	25	87
	TF	1,6-50	6,3	25	71
	FF	0,8-6,3	3,1	3,1	100
<i>Staphylococcus aureus</i> (15)	CF	0,8-50	6,3	50	80
	TF	1,6->200	25	>200	50
	FF	0,4-6,3	3,1	6,3	100
<i>Enterococci</i> (15)	CF	6,3-50	6	50	80
	TF	6,3->100	6,3	>200	0
	FF	3,1	3,1	3,1	100
<i>Haemophilus influenzae</i> (15)	CF	<0,4-1,6	1,6	1,6	100
	TF	0,8-25	1,6	25	0
	FF	<0,4-0,8	0,8	0,8	100
<i>Neisseria gonorrhoea</i> (15)	CF	1,6-25	6,3	6,3	100
	TF	25-50	6,3	12,5	100
	FF	0,8-3,1	1,6	3,1	100

(a) N° de cepas analizadas / CF: Cloranfenicol / TF: Tianfenicol / FF: Florfenicol

El segundo trabajo de la actividad antimicrobiana de cloranfenicol, tianfenicol y su principal análogo fluorado, florfenicol, data del año 1981, sus autores SYRIOPOULOU *et al.*, estudiaron diversas cepas antibiótico-resistentes de la familia *Enterobacteriaceae* y 60 cepas de *Haemophilus influenzae*. En el caso de la especie *Haemophilus influenzae*, existen datos (TABLA 3) que demuestran la excelente actividad del florfenicol comparada con la del cloranfenicol y del tianfenicol frente a cepas del mencionado microorganismo resistentes a estos dos últimos compuestos y a la ampicilina (SYRIOPOULOU *et al.*, 1981).

TABLA 3. Sensibilidad de cepas ampicilina-resistentes de *Haemophilus influenzae* frente a cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol (SYRIOPOULOU *et al.*, 1981).

Compuesto	Nº de cepas inhibidas con CMI ($\mu\text{g/ml}$) de:		
	0,5	1	5
Cloranfenicol	51	2	-
Tianfenicol	20	33	-
Florfenicol	53	-	-

En 1995, UEDA y SUENAGA, estudiaron la actividad antibacteriana *in vitro* de florfenicol frente a 50 serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, comparada con otros agentes antibacterianos (tianfenicol, oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina y ampicilina). La CMI del florfenicol era de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, frente a la CMI calculada para el tianfenicol que fue superior a 100 $\mu\text{g/ml}$, este último presentó resistencia frente al 92% de las cepas (UEDA y SUENAGA, 1995).

De estos estudios, se concluye una mayor actividad del florfenicol comparada con los otros dos fenicoles, frente a numerosos microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos, en particular, frente a enterobacterias de origen humano resistentes al cloranfenicol debido a la producción de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) codificada por plásmidos (NEU y FU, 1980; SYRIOPOULOU *et al.*, 1981). El espectro de actividad *in vitro* del florfenicol y del cloranfenicol frente a diversas especies de bacterias de origen animal es cualitativamente similar. Sin embargo, el espectro de actividad del florfenicol es cuantitativamente superior, siendo esta diferencia más acusada en microorganismos como *Pasteurella* spp. y *E. coli* (WIG y BROWN, 1983).

1.3.1. Cloranfenicol

El espectro antimicrobiano del cloranfenicol fue durante varias décadas notable. El cloranfenicol es un agente bactericida frente a los microorganismos *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria* spp. (RAHAL y SIMBERKOFF, 1979) y ejerce una acción bacteriostática frente a gran parte de bacterias Gram-positivas y frente a muchas Gram-negativas aerobias y anaerobias (SMITH y WEBER, 1983), así como frente a la familia *Chlamydia*, y *Rickettsia* (McLEAN *et al.*, 1940). La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *N. asteroides* y *Proteus* spp. indol-positivo son resistentes (SMITH y WEBER, 1983) al cloranfenicol.

En las pruebas *in vivo*, los micoplasmas pueden ser sensibles al cloranfenicol.

Sin embargo, muchas veces el resultado del tratamiento con cloranfenicol de las infecciones pulmonares producidas por estos microorganismos es ineficaz (ONIVIRAN, 1974).

BACHMAN *et al.* (1975) estudiaron la actividad comparada *in vitro* del cloranfenicol y de otros antibióticos frente a microorganismos aislados clínicamente de diferentes especies animales, y demostraron una excelente actividad del cloranfenicol, con un 93% de eficacia media en los 2.762 cultivos analizados (TABLAS 4 y 5).

TABLA 4. Eficacia *in vitro* del antibiótico cloranfenicol* frente a géneros de bacterias aisladas de muestras clínicas de perros, gatos, équidos y bóvidos (BACHMAN *et al.*, 1975).

Microorganismo	% Eficacia	Microorganismo	% Eficacia
Gram-negativos		Gram-positivos	
<i>Pseudomonas</i> spp	59%	<i>Staphylococcus</i> spp.	96%
<i>Proteus</i> spp.	79%	<i>Streptococcus</i> spp.	95%
<i>Escherichia</i> spp.	96%	Otros Gram-positivos	92%
<i>Aerobacter</i> spp.	98%		
<i>Klebsiella</i> spp.	91%		
Otros Gram-negativos	94%		
Total 1637/1778	92%	Total 932/984	95%

(*) Discos de 30 µg de cloranfenicol.

TABLA 5. Eficacia *in vitro* del antibiótico cloranfenicol frente a bacterias aisladas de perros, gatos, équidos y bóvidos (BACHMAN *et al.*, 1975).

Especie animal	Equidos	Gatos	Perros	Bóvidos	Total
----------------	---------	-------	--------	---------	-------

	192/219	67/75	707/786	603/1682	2569/2762
% Eficacia	88%	89%	90%	95%	93%

PRESCOTT *et al.* (1991 y 2000) demostraron la sensibilidad de las bacterias Gram-positivas al cloranfenicol, tal como se indica en la TABLA 6, y de igual forma con las bacterias Gram-negativas no entéricas.

TABLA 6. Actividad del antibiótico cloranfenicol frente a bacterias y micoplasmas seleccionados (PRESCOTT y BAGGOT, 1991).

Microorganismo	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Microorganismo	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Aerobias Gram-positivas					
<i>Actinobacillus pyogenes</i>	4	8	<i>L. monocytogenes</i>	4	8
<i>A. anthracis</i>	5	<25	<i>N. asteroides</i>	16	64
<i>M. pseudotuberculosis</i>	1	2	<i>R. equi</i>	16	16
			<i>Staphylococcus aureus</i>	≤5	12,5*
<i>C. renale</i>	3,1	3,1	<i>S. agalactiae</i>	3,1	6,2
<i>E. rhusiopathiae</i>	1,2	1,2	<i>Streptococcus uberis</i>	2	2
			<i>Estreptococos del</i>	3,2	6,3
			Grupo C		
Anaerobias gram-positivas					
<i>Actinomyces</i> spp	4	8			
<i>C. perfringens</i>	4	4	<i>C. septicum</i>	2	2
			<i>Clostridium</i> spp	1,6	3,1
Aerobias gram-negativas					
<i>Actinobacillus</i> spp	≤0,5	4	<i>Leptospira</i> spp	20	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	2	8	<i>M. bovis</i>	0,8	
<i>B. canis</i>	1,6	3,1	<i>P. multocida</i>	1	2
<i>C. jejuni</i>	2	4*	<i>P. haemolytica</i>	2	2
<i>Escherichia coli</i>	4	32*	<i>Proteus</i> spp.	8	>32
<i>H. equigenitalis</i>	0,4	0,8	<i>P. aeruginosa</i>	128	>256
<i>H. pleuropneumoniae</i>	0,4	0,8	<i>Y. enterocolitica</i>	4	4
<i>Haemophilus somnus</i>	0,4	0,4			
<i>Klebsiella</i> spp	4	>32			
Anaerobias Gram-negativas					
<i>Bacteroides fragilis</i>	4	8	<i>Fusobacterium</i> spp	≤0,5	1
<i>Bacteroides nodosus</i>		0,25	Todas las anaerobias	2	8
<i>E. necrophorum</i>		2	<i>T. hyodysenteriae</i>	1,6	3,1
Micoplasmas					
<i>Mycoplasma bovis</i>		4-8	<i>M. hyopneumoniae</i>		4
<i>Mycoplasma canis</i>	5	10	<i>Ureaplasma</i>		6,2

(*) Algunos valores son mucho más elevados debido a la resistencia de las cepas ensayadas.

La resistencia *in vivo* de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos al cloranfenicol ha sido, hasta hace poco tiempo, un problema creciente en la

terapéutica veterinaria. Esta resistencia de las bacterias Gram-negativas al fármaco es transmitida por un plásmido R, que codifica la presencia de una enzima específica, acetiltransferasa, que inactiva el fármaco. Las *Enterobacteriaceas* poseen una resistencia en aumento, tanto por áreas geográficas, como por especies, como se comprueba en las TABLAS 7 y 8 (PRESCOTT y BAGGOT, 1991).

TABLA 7. Bacterias sensibles al cloranfenicol (CMI<12,5 µg/ml) aisladas en bóvidos en diversas áreas geográficas (PRESCOTT y BAGGOT, 1991).

Microorganismo	Procedencia			
	Canadá (%)	Estados Unidos (%)	Suiza (%)	Bélgica (%)
<i>S. aureus</i>	85	99	93	99
<i>S. agalactiae</i>	70	100	99	100
<i>S. dysgalactiae</i>	95	100	97	100
<i>S. uberis</i>	96	100	-	100
<i>C. renale</i>	86	-	-	-
<i>E. coli</i> productor toxina	21	-	-	61
<i>E. coli</i> no productor tox*	68	93	79	-
<i>Klebsiella</i> spp.	67	100	-	-
<i>P. multocida</i>	94	99	-	100
<i>P. haemolytica</i>	94	98	-	100
<i>Salmonella</i> spp.	76	-	-	-

(*) De procedencia no intestinal, a diferencia del *E. coli* productor de toxina que figura en la línea anterior.

TABLA 8. Bacterias sensibles al cloranfenicol (CMI<12,5 µg/ml) aisladas en distintas especies en diferentes áreas geográficas (PRESCOTT, 1984).

Microorganismo	Perro y gato		Equidos		Todas especies
	Canadá(%)	EEUU (%)	Canadá (%)	EEUU (%)	EEUU (%)
<i>S. aureus</i>	91	89	94	100	96
Estreptococos β-hemolíticos	97	87	100	100	97
Estreptococos α-hemolíticos	-	100	-	-	-
<i>Actinobacillus</i> spp.	-	-	100	-	-
<i>B. bronchiseptica</i>	100	-	100	-	97
<i>E. coli</i>	58	81	70	100	89
<i>Klebsiella</i> spp.	36	33	88	100	80
<i>Proteus</i> spp.	73	82	67	88	88
<i>P. aeruginosa</i>	22	18	23	7	27
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	39	-	99

1.3.2. Tianfenicol

El antibiótico tianfenicol posee una actividad *in vitro* similar a la del cloranfenicol (KAISER y WURST, 1974; VAN BEERS *et al.*, 1975) frente a los microorganismos *Haemophilus* spp., *Bacteroides fragilis* y estreptococos (FERRARI, 1984), siendo una o dos veces menos activo que el cloranfenicol para el resto de los microorganismos. El tianfenicol tiene actividad frente a microorganismos resistentes al cloranfenicol (NEU y KWUNG, 1980).

El tianfenicol, a pesar de su menor eficacia, al no poseer el mismo perfil toxicológico que el cloranfenicol, tuvo su oportunidad de desarrollo en terapéutica humana a mediados de los años 60 (FERRARI *et al.*, 1967), cuando se determinó la relación directa entre el uso del cloranfenicol y el

desarrollo de graves e irreversibles discrasias sanguíneas. Su uso en medicina veterinaria es reciente (procesos respiratorios y entéricos en bóvidos, suidos, óvidos y especie aviar; y peces frente a vibriosis y pasteurelisis), pero está muy reducido en Europa y no está registrado en los Estados Unidos de América.

1.3.3. Florfenicol

Coincidiendo con la prohibición del uso de cloranfenicol en animales de abasto, por su demostrada ausencia de seguridad, se desarrollaron nuevas sustancias con fines terapéuticos para animales productores de alimentos, como derivados de cefalosporinas no tóxicas de amplio espectro o derivados del cloranfenicol, antimicrobianos que han permitido ocupar el vacío terapéutico creado por la retirada del cloranfenicol.

Con el fin de ocupar el vacío creado por la retirada del cloranfenicol y por su espectro de actividad, el florfenicol se enfocó desde su desarrollo al ámbito veterinario (NEU y KWUNG, 1980).

El florfenicol es un antibiótico sintético de amplio espectro, con un comportamiento bacteriostático frente a la mayoría de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (aerobias y anaerobias) aisladas en animales domésticos. Sin embargo, para algunos microorganismos, sus CMI están próximas a sus CMB, por lo que, en tales casos, puede comportarse como un agente

bactericida (este es el caso para bacterias como *P. haemolytica* y *P. multocida*, agentes causales del Síndrome Respiratorio en ganado bovino).

Estudios realizados por ZIV (1986) y LOBELL (1991) muestran que la actividad *in vitro* del florfenicol frente a diversas especies patógenas de origen animal, principalmente enterobacterias, es similar a la del cloranfenicol con una clara ventaja frente a especies que se hicieron resistentes al cloranfenicol (ZIV, 1986; LOBELL, 1991).

La actividad comparada de los compuestos análogos: cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol, en el caso concreto de cepas resistentes al cloranfenicol, indica que salvo para los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus marcescens* y *Acinetobacter*, el florfenicol inhibe el crecimiento a unos niveles alcanzables en el animal *in vivo* (NEU y KWUNG, 1980) (TABLA 9).

TABLA 9. Actividad comparada de cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol frente a bacterias resistentes (NEU y KWUNG, 1980).

Microorganismo	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	Cloranfenicol	Tianfenicol	Florfenicol
<i>Escherichia coli</i>	100	>200	3,1
<i>Enterobacter cloacae</i>	>200	>200	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>200	>200	3,1
<i>Providencia</i>	>200	>200	12,5
<i>Streptococcus marcescens</i>	>200	>200	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	200	100
<i>Salmonella typhimurium</i>	>200	>200	3,1
<i>Proteus rettgeri</i>	>200	>200	12,5
<i>Proteus vulgaris</i>	>200	>200	12,5
<i>Acinetobacter</i>	100	>200	100
<i>Shigella sonnei</i>	100	>200	3,1
<i>Citrobacter freundii</i>	>200	>200	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	200	3,1
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	50	50	12,5
<i>Salmonella typhi</i>	>100	>100	3,1

NEU y KWUNG determinaron en 1980 la actividad del florfenicol en cepas con una CMI para el cloranfenicol superior a 25 $\mu\text{g/ml}$. El resultado demostró que el florfenicol inhibía la mayoría de *E. coli*, el 50% de *Klebsiella* y todas las cepas de *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y *S. aureus* (TABLA 10).

TABLA 10. Actividad de florfenicol frente a cepas resistentes a cloranfenicol a niveles de 25 µg/ml (NEU y KWUNG, 1980).

Microorganismo (N)	% Resistencia
	Florfenicol
<i>E. coli</i> (11)	18
<i>Shigella</i> (4)	0
<i>Klebsiella</i> (13)	46
<i>Enterobacter</i> (2)	100
<i>Salmonella</i> (7)	0
<i>Citrobacter</i> (2)	50
<i>Providencia</i> (20)	25
<i>Pseudomonas</i> (7)	100
<i>Acinetobacter</i> (8)	100
<i>S. aureus</i> (3)	0
<i>Enterococcus</i> (1)	0
<i>Bacteroides</i> (2)	0

(N) N° de aislados

Otros estudios llevados a cabo por SYRIOPOULOU *et al.* (1981) sobre la actividad de los tres compuestos (cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol) demuestran actividad *in vitro* de florfenicol frente a cepas de *Shigella dysenteriae* resistentes al cloranfenicol/tianfenicol. Lo mismo sucede con las cepas de *Salmonella typhi* estudiadas, y aunque con menor eficacia también resulta activo frente a *E. coli* y *K. pneumoniae* (TABLA 11).

WIG y BROWN, comparan en 1983 la actividad *in vitro*, de florfenicol y cloranfenicol frente a diversas bacterias de origen animal aerobias y anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas, y demuestran que ambos tienen un espectro cualitativamente similar, siendo el del florfenicol cuantitativamente ventajoso, concretamente frente a *Pasteurella* spp, *E. coli*, *Haemophilus* spp y *Corynebacterium pyogenes*. También demuestra que tiene una actividad muy

marcada frente a aquellos microorganismos con elevado número de resistencias frente a cloranfenicol, como *E. coli* (WIG y BROWN, 1983).

TABLA 11. CMI de *Enterobacteriaceae* y resultados frente a cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol (SYRIOPOULOU *et al.*, 1981).

Especie	Compuesto	Nº de cepas con CMI ($\mu\text{g/ml}$) de:				
		1	5	10	50	≥ 100
<i>S. dysenteriae</i> (18)	CF					18
	TF					18
	FF	18				
<i>S. typhi</i> (21)	CF					21
	TF					21
	FF	1	20			
<i>E. coli</i> (6)	CF					6
	TF					6
	FF		1	4	1	
<i>K. pneumoniae</i> (7)	CF					7
	TF					7
	FF	3	3	1		

(N)Número de cepas incluidas en el ensayo.

CF: Cloranfenicol / TF: Tianfenicol / FF: Florfenicol

ZIV *et al.* (1987) determinaron *in vitro* la superior actividad del florfenicol frente a la del cloranfenicol ante diversas especies patógenas bacterianas de origen animal, centrándose principalmente en aquellas cepas resistentes al cloranfenicol por la producción de la enzima CAT. Estos autores estudiaron 354 aislados bacterianos Gram-negativos obtenidos de terneros. La CMI₅₀ y la CMI₉₀ obtenidas para el florfenicol frente a *E. coli* y frente a *Salmonella* spp. alcanzaron valores de 3,12 $\mu\text{g/ml}$ y 6,25 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que los valores obtenidos para el cloranfenicol y el tianfenicol fueron de 50 $\mu\text{g/ml}$ y >100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (ZIV *et al.*, 1987).

Estos mismos autores comprobaron las actividades de los tres análogos en 142 aislados patógenos procedentes de pollos de engorde (ZIV *et al.*, 1987). La CMI₉₀ obtenida para el florfenicol frente a 48 cepas de *E. coli* y 61 de *Salmonella* spp. fue de 6,25 µg/ml y 12,5 µg/ml, respectivamente. Sin embargo, los valores hallados para los otros compuestos análogos fueron superiores a 100 µg/ml. Así mismo, para los aislados de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* de origen aviar, el florfenicol tuvo unos valores de CMI₉₀ de 3,12 µg/ml y 6,25 µg/ml, respectivamente, mientras que los valores para el tianfenicol indicaron resistencias en el 50% de los casos.

GRAHAM *et al.* (1988), estudiaron la actividad *in vitro* del florfenicol frente a una serie de microorganismos y la compararon con la del cloranfenicol. A concentraciones de 8 µg/ml e inferiores, el florfenicol, inhibió más del 98% de los aislados muestreados (TABLA 12). A esta concentración, sólo una de las *Salmonella* spp. y tres de los aislados de *Klebsiella aerogenes* fueron resistentes al florfenicol. Sin embargo, el 29% de los aislados fueron resistentes al cloranfenicol a esta misma concentración. Al comparar las CMI de ambos compuestos para cada aislado, GRAHAM *et al.* (1988) observaron que florfenicol en el 56% de ellos tenía una CMI inferior; y en 79 de los 234 aislados la CMI del florfenicol era significativamente inferior (al menos 4 veces) a la del cloranfenicol. Esta diferencia se mostró con mayor claridad en el caso de *H. influenzae* (GRAHAM *et al.*, 1988).

En lo que se refiere a micoplasmas, mientras que, en las pruebas *in vitro*, parecen ser resistentes al florfenicol, está descrito en la bibliografía, que el resultado del tratamiento con florfenicol de las infecciones pulmonares en la especie bovina producidas por estos microorganismos es eficaz (ALMAJANO *et al.*, 1998), manteniendo niveles de curación elevados (97%) en presencia de *Mycoplasma bovis*.

GONGZHENG y LI (2003) estudiaron el efecto postantibiótico del florfenicol en comparación con el tianfenicol. Partieron de cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que expusieron a 3 concentraciones diferentes de los antibióticos (2, 4 y 8 veces la CMI) durante dos horas. Estos autores obtuvieron un efecto PAE de entre 0,48 y 2,07 horas y entre 0,18 y 0,83 horas para el florfenicol y el tianfenicol respectivamente. El efecto PAE inducido por el florfenicol fue más duradero que los valores del tianfenicol. En el grupo de los fenicoles el efecto PAE puede deberse al tiempo que requieren para disociarse los complejos antimicrobiano/ribosoma, según su modo de acción; este efecto se considera que puede contribuir a mejorar su eficacia clínica.

TABLA 12. Susceptibilidad comparada de aislados clínicos frente a cloranfenicol y florfenicol (GRAHAM *et al.*, 1988).

Microorganismo	Nº de aislados ensayados	Nº de aislados con CMI a determinada concentración (µg/ml)																
		Cloranfenicol								Florfenicol								
		0,5	1	2	4	8	16	32	>32	0,5	1	2	4	8	16	32	>32	
<i>Staphylococcus aureus</i>	10					9			1					10				
<i>Staphylococci coagulasa negat.</i>	10			1	1	6			2				2	8				
<i>Streptococci Grupo A</i>	9				9								9					
<i>Streptococci Grupo B</i>	10				10								10					
<i>Streptococcus milleri</i>	10			1	9						1	4	5					
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11				11							11						
<i>Escherichia coli</i>	5				1	2			2				1	4				
<i>Klebsiella aerogenes</i>	14					1			13					11	1			2
<i>Salmonella spp.</i>	9				1	6			2				1	7				1
<i>Shigella spp.</i>	8			1		7						1		7				
<i>Campylobacter spp.</i>	8			7		1						7		1				
<i>Pasteurella spp.</i>	4		3	1								4						
<i>Moraxella spp.</i>	3		3								2	1						
<i>Haemophilus influenzae</i>	34		12						21	1	1	21	12					
<i>Neisseria meningitidis</i>	10			10									10					
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	25		2	14	8			1				18		7				
<i>Bacteroides spp.</i>	31		1		3	3			3	21	2	2	4		23			
<i>Clostridium spp.</i>	20		2	5	7	5			1		3	8	5	4				
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	3		1	2							2	1						

1.4. Resistencias de los fenicoles

1.4.1. Cloranfenicol y tianfenicol

Existe una relación causa-efecto entre el empleo de agentes antimicrobianos y la aparición de resistencias frente a los mismos. En veterinaria, el estudio de la aparición de resistencias totalmente comprobadas se ha centrado en cepas de microorganismos como *Salmonella* Typhimurium o bacterias entéricas como *Escherichia coli*, por ser el intestino la localización principal del organismo donde tiene lugar la transmisión de la resistencia a los antibióticos. Tanto en los microorganismos patógenos no entéricos, como en los patógenos oportunistas, se han realizado relativamente pocas investigaciones acerca de la aparición de estas resistencias. En los patógenos oportunistas, la resistencia constituye un grave problema en la clínica hospitalaria humana, si bien se dispone de pocos datos de hospitales veterinarios.

La resistencia puede ser adquirida por una mutación y transferida de forma vertical. Sin embargo, es más común el proceso horizontal de una célula donante que transfiere esa resistencia en muchos casos a otras especies bacterianas mediante transformación, transducción o conjugación. Este último mecanismo permite que este fenómeno se extienda de forma rápida mediante clonación de la nueva cepa resistente o mediante intercambio genético entre la cepa resistente y otras cepas susceptibles.

El mecanismo de transducción tiene lugar mediante la intervención de un virus bacteriófago (un virus que infecta una bacteria), que contiene ADN bacteriano incorporado en su proteína. Si este material genético incluye un gen que codifica la resistencia a un antimicrobiano, una célula recién infectada se hará resistente a ese agente antimicrobiano y será capaz de transmitir a otras células este nuevo carácter. Este mecanismo es de gran importancia en el caso de transmisión de resistencia en *Staphylococcus aureus*, pues pueden existir plásmidos (fragmentos de ADN extracromosómicos con capacidad para la replicación autónoma) que codifican penicilinasa u otros genes con plásmidos de resistencia a la eritromicina o tetraciclina. Este mecanismo también es compartido por el cloranfenicol, que con frecuencia se incluye en los factores R de resistencia múltiple.

En el caso de conjugación, existe transferencia de célula a célula por contacto directo a través de un pilus sexual. Este es el mecanismo de mayor importancia para la difusión de resistencias ya que el ADN que codifica para la resistencia múltiple puede ser transferido de esta forma. Este mecanismo requiere dos grupos de genes en los plásmidos; el primero codifica para la resistencia y se denomina plásmido R-determinante. En el caso de resistencia al cloranfenicol, el factor R codifica la síntesis del enzima neutralizante del agente antimicrobiano (DAVIES, 1994). El segundo plásmido, denominado factor de transferencia de resistencia (FTR), incluye los genes necesarios para la conjugación bacteriana. Ambos plásmidos pueden existir también de forma independiente.

Durante los últimos 30 años la proporción de bacterias entéricas que transportan plásmidos de resistencia múltiple ha ascendido inexorablemente. Existen estudios en que más del 50% de personas tenían bacilos coliformes multiresistentes con factores R, y tales bacterias se han aislado en muchos casos de ríos con aguas residuales no tratadas.

Así, la resistencia de los microorganismos al cloranfenicol en gran medida es mediada por plásmidos. Y con frecuencia se debe a factores R de resistencia múltiple. En el año 1982, en el Laboratorio Central Veterinario de Weybridge (Reino Unido), se realizaron análisis de cultivos de *E. coli* resistentes al cloranfenicol, demostrando que gran parte de ellos eran también resistentes a antibióticos como ampicilina, estreptomina, tetraciclina o sulfamidas.

En la mayoría de los casos, estos plásmidos codifican acetiltransferasas intracelulares, enzimas capaces de acetilar el cloranfenicol en el grupo hidroxilo del C-3 utilizando como fuente la acetilcoenzima A y transformarlo en un derivado inactivo (SHAW, 1971; NEU y KWUNG, 1980; SYRIOPOULOU *et al.*, 1981). Esta acetilación impide la interacción de ambos compuestos con los ribosomas bacterianos, anulando así su actividad antimicrobiana.

Desde el comienzo del descubrimiento (ERLICH *et al.*, 1947) y aplicación del cloranfenicol en medicina en el año 1947, hasta su prohibición en animales productores de alimentos (1985 en Canadá, 1986 en Estados Unidos de

América, 1994 en la Unión Europea) se ha comprobado que, siendo un antibiótico de amplio espectro, la aparición de resistencias ha ido en aumento (HERZOG, 1976, KENNEDY *et al.*, 1980, RADETSKY *et al.*, 1981), lo que podría comprometer el éxito del tratamiento en el hombre. En este sentido, se ha sugerido que el uso terapéutico del cloranfenicol por vía oral en animales es responsable de seleccionar cepas resistentes a antibióticos, que comprometen el tratamiento de infecciones en el hombre.

El aumento de resistencias *in vivo* de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos al cloranfenicol constituyó un problema de importancia clínica creciente. La resistencia a bacterias Gram-negativas, como ya hemos mencionado, se debe a un plásmido adquirido por conjugación, que contiene la acetiltransferasa específica que inactiva el fármaco.

Se han caracterizado al menos 3 tipos de estos enzimas (GAFFNEY y FOSTER, 1978). Los derivados acetilados del cloranfenicol no consiguen unirse a los ribosomas bacterianos (PIFFARETTI y FROMENT, 1978). Las cepas de *H. influenzae* que son resistentes al cloranfenicol incluyen plásmidos que codifican no sólo la producción de acetiltransferasa, sino también la resistencia a las tetraciclinas. Incluso, la pueden codificar la síntesis de β -lactamasas que provocan la resistencia a ampicilina (DOERN *et al.*, 1988).

Ya en el año 1967, se detectaron aumentos del número de cepas resistentes al cloranfenicol en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. En ese año, en el

hospital Boston City, se hallaron altos porcentajes de resistencia frente al cloranfenicol: *Klebsiella* (55%), *Enterobacter* (47%) y *Proteus* (28%) (FINLAND, 1970).

Los primeros casos de cepas de *Shigella* resistentes al cloranfenicol se detectaron a principios de los años 50. En los 70 en muy diversos países, se detectaron cepas resistentes al cloranfenicol del microorganismo *Salmonella typhi* (ANDERSON y SMITH, 1972).

Existen casos graves descritos de ineficacia del cloranfenicol *in vivo*, como la epidemia por *Salmonella typhi* en Méjico y Estados Unidos de América entre los años 1972 y 1973 (BAINE *et al.*, 1977).

Este descenso en su eficacia se agravó a partir del año 1980, cuando comenzaron a describirse resistencias de un gran número de patógenos (*H. influenzae* (KENNEDY *et al.*, 1980), *S. pneumoniae* (RADETSKY *et al.*, 1981); *Salmonella* spp. (HERZOG, 1976)) frente al cloranfenicol y comenzó a cuestionarse su eficacia en la terapéutica veterinaria.

Se han descrito otras formas de resistencia para el cloranfenicol. Se partió de análogos que carecían del grupo 3-hidroxilo, y se valoró la actividad CAT en extractos celulares. Los aislados resistentes al cloranfenicol, tianfenicol y análogos fluorados contenían menos del 10% de la actividad acetil-transferasa de las cepas que eran resistentes al cloranfenicol y tianfenicol solos. Se

comprobó que el mecanismo de resistencia en cepas que carecen de esta enzima, se basa en una alteración de la permeabilidad de la membrana bacteriana, es el caso ante microorganismos como *Haemophilus influenzae* (ROBERTS *et al.*, 1980; BURNS *et al.*, 1985), y de *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. y ciertas cepas de *E. Coli* (SOMPOLINSKY y SAMRA, 1968) o en la reducción enzimática del grupo nitro por bacterias con alteración de la unión a la subunidad ribosómica, es el caso del *Bacillus subtilis* (OSAWA *et al.*, 1973).

A este dato referente al aumento de resistencias, y su menor eficacia por tanto, se sumó, como causa desencadenante, la anemia aplásica, ya descrita en el año 1964 (YUNIS *et al.*, 1964); así, por sus graves consecuencias toxicológicas, su uso en medicina humana quedó reducido a casos muy concretos. Mientras, en medicina veterinaria se prohibió su uso en animales de abasto.

El tianfenicol tiene resistencias cruzadas con el cloranfenicol, debido a que en su estructura química mantiene el mismo radical susceptible que el cloranfenicol, el grupo hidroxilo en el C-3 de la molécula.

La resistencia múltiple a la familia *Enterobacteriaceae* se ha convertido en un problema mundial. El principal punto de control en lo que concierne a la resistencia de agentes antimicrobianos es el uso responsable de ellos, y la introducción de nuevos agentes terapéuticos con indicaciones bien definidas y restringidas.

1.4.2. Florfenicol

La sustitución del grupo hidroxilo del C-3 del cloranfenicol en el florfenicol por un átomo de flúor impide la acetilación por la CAT, confiriéndole al florfenicol actividad antibacteriana frente a microorganismos resistentes al cloranfenicol y tianfenicol. El florfenicol, al igual que los otros dos análogos induce la síntesis de CAT en microorganismos como *Staphylococcus aureus*; sin embargo, el florfenicol no es un sustrato para esta enzima, carece de afinidad por él y por tanto, no puede ser inactivado por él (CANNON *et al.*, 1990).

Para llegar a este punto, se estudió específicamente el efecto de la CAT sobre la afinidad del florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Además se midió la capacidad de cada antibiótico para inducir la producción de este enzima inactivante. Las cepas bacterianas que carecían de CAT fueron inhibidas por los tres antibióticos. Las cepas que producían CAT se inhibían por el florfenicol pero no por tianfenicol ni por cloranfenicol. El florfenicol inhibió la enzima mediante la formación de complejos no productivos con el radical acetilo.

De este modo se explica la eficacia del florfenicol frente a bacterias resistentes al cloranfenicol y al tianfenicol. Esta es una clara ventaja del florfenicol frente a sus análogos estructurales, pues es eficaz frente a cepas portadoras de plásmidos que codifican resistencia para el cloranfenicol y el tianfenicol.

No se han descrito para el florfenicol otros mecanismos de resistencia bacteriana descritos para el cloranfenicol y el tianfenicol, como la alteración de la permeabilidad de la membrana de la bacteria, o una modificación del lugar de unión a la subunidad del ribosoma mediante reducción enzimática del grupo nitro por la bacteria (proceso descrito para *Bacillus subtilis*).

Otro estudio que se llevó a cabo sobre sensibilidad (prueba de CMI) de doce agentes antimicrobianos sobre 175 cepas de *Pasteurella piscicida* recogidos de cultivos de *Seriola quinqueradiata* obtenidos de diversas áreas de Japón desde 1989 a 1991; 152 cepas resultaron resistentes a combinaciones de cloranfenicol, ampicilina, kanamicina, ácido nalidíxico, tetraciclina y/o trimetoprim, y sensibles a florfenicol. Las restantes 23 cepas resultaron sensibles a todos los agentes utilizados, entre ellos el florfenicol. Este último resultó tener la mayor eficacia antimicrobiana frente a *P. piscicida* con una CMI que osciló entre 0,004 y 0,6 µg/ml. De las 152 cepas resistentes utilizadas 149 portaban plásmidos R de transferencia múltiple (KIM y AOKI, 1993).

UEDA y SUENAGA estudiaron en Japón, durante los años 1989 a 1993, la sensibilidad *in vitro* frente al florfenicol y a otros agentes antimicrobianos, sobre 90 cepas de *A. pleuropneumoniae* aisladas de pulmones neumónicos de la especie porcina. Las CMI de *A. pleuropneumoniae* frente al florfenicol variaron entre 0,2 y 1,56 µg/ml con un máximo en 0,39 µg/ml. El florfenicol mostró una actividad antimicrobiana elevada frente a cepas resistentes al tianfenicol

(UEDA y SUENAGA, 1995).

Similares resultados de ausencia de resistencia se obtuvieron en el estudio llevado a cabo en 1994 (NORDMO *et al.*, 1994) ante brotes de forunculosis (*A. salmonicida*) en salmón atlántico, en el que los grupos medicados con florfenicol tuvieron una mortalidad significativamente menor que aquellos medicados con ácido oxolínico, flumequina o combinaciones de trimetoprim y sulfadiazina.

En 1992 ZHAO *et al.* estudiaron la sensibilidad de 114 cepas de *Vibrio anguillarum* obtenidas de cultivos de *Plecoglossus altivelis* entre 1989 y 1991 frente a 10 agentes antimicrobianos. De todos los agentes utilizados, el florfenicol resultó el de mayor eficacia antimicrobiana frente a todas las cepas. Todas las cepas excepto una (sensible a todos los fármacos) mostraron resistencia a combinaciones de agentes, pues portaban plásmidos R de resistencia múltiple a cloranfenicol, kanamicina, estreptomicina, tetraciclina y trimetoprim (ZHAO *et al.*, 1992).

1.5. Indicaciones Clínicas

1.5.1. Cloranfenicol y tianfenicol

El primer uso terapéutico del cloranfenicol fue en un brote de tifus en Bolivia, en 1947, produciendo excelentes resultados. Desde su descubrimiento en 1947 (BARTZ, 1948), el cloranfenicol fue ampliando sus indicaciones en medicina humana: meningitis tipo B por *H. influenzae*, rickettsiosis como la Fiebre de las "Montañas Rocosas", infecciones oftálmicas, por su excelente penetración en los tejidos oculares (WATSON y McDONALD, 1976; KEEN, 1979), infecciones del Sistema Nervioso Central (debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica tanto en aquellos casos en que las meninges estaban inflamadas como en estado fisiológico, siendo esta última característica hallada con menos frecuencia entre los antibióticos (KEEN, 1979), salmonelosis tifoidea y no tifoidea (HERZOG, 1976), infecciones entéricas (MERCER *et al.*, 1978), infecciones urinarias, por su eliminación como compuesto inalterado (10%) vía renal (CLARK, 1978) e infecciones cutáneas.

En el ámbito de la medicina veterinaria, su uso, teniendo en cuenta sus características ideales, ya descritas, para la terapéutica en este campo, fue igualmente aumentando y aplicándose de forma habitual en todas las especies de abasto (incluyendo piscicultura), así como en cánidos, félicos y équidos; fundamentalmente en: infecciones del tracto respiratorio

(pasterelosis causada por *P. haemolytica* y *P. multocida* o haemophilosis causada por *H. somnus*), del tracto gastrointestinal (salmonelosis e infecciones causadas por *E. coli*), infecciones por rickettsias, mamitis por coliformes (en ganado vacuno, ovino y caprino), infecciones oculares profundas o meningitis entre otras muchas indicaciones.

Pocos años después de su descubrimiento, en los años 50, comenzaron a describirse resistencias entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (FINLAND, 1970), hecho previamente comentado.

Prescindiendo de sus propiedades bacteriostáticas y de su escasa actividad en relación con la dosis utilizada, el cloranfenicol tiene muchas propiedades que lo califican como un antibiótico ideal para la terapéutica veterinaria. Difunde rápidamente en los tejidos, encéfalo, líquido cefalorraquídeo y humor acuoso. En los animales es relativamente atóxico. Tiene un amplio espectro de acción frente a bacterias, rickettsias, clamidias y frente a algunos micoplasmas. Sin embargo, los dos efectos secundarios graves ya comentados sobre la salud humana, han hecho que su uso se haya limitado a los animales de compañía en la Unión Europea, Estados Unidos de América y Canadá.

En veterinaria, en el marco europeo, hasta su retirada en animales de abasto, en el año 1994, se utilizaba en el tratamiento de procesos anteriormente mencionados como: salmonelosis sistémicas producidas por

microorganismos resistentes a otros antibióticos, colibacilosis, pasteurelisis, infecciones oculares profundas producidas por bacterias Gram-negativas e infecciones provocadas por anaerobios, así como en casos de meningitis y mastitis por coliformes.

En avicultura, el cloranfenicol se ha utilizado eficazmente en el tratamiento de muy diversas infecciones, especialmente aquellas causadas por bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* (PHUKAN, 1989) o *Salmonella* spp. (LUTHGEN, 1978), concretamente en *Salmonella* Typhimurium en pollos (MACKENZIE y BAINES, 1974).

A pesar de su prohibición en animales de abasto y de sus potenciales efectos secundarios, en medicina humana se mantiene su utilización en diversas formas farmacéuticas (colirio, cápsulas orales o inyectable), para el tratamiento de procesos muy específicos como: actinomicosis, *H. influenza*, procesos tifoideos o meningitis.

En lo relativo al tianfenicol, segundo compuesto de esta familia, su uso se ha extendido hoy en día en la Unión Europea en medicina humana. No se han detectado indicios de desarrollo de las discrasias sanguíneas irreversibles (fundamentalmente anemia aplásica) causadas por la primera generación de esta familia, el cloranfenicol.

En la Unión Europea, en medicina veterinaria, Italia ha autorizado su

comercialización para porcino, bovino y aves, especies en las que tiene el Límite Máximo de Residuos (LMR) aprobado por la EMEA-CVMP (Committee of Veterinary Medicinal Products), así como para cánidos. Se pueden encontrar dos presentaciones: polvo soluble para administración oral, de tianfenicol glicinato y tianfenicol solubilizado en solventes orgánicos, para su aplicación parenteral (LAVY *et al.*, 1991); pero es probable que paulatinamente irá siendo registrado en otros países de la Unión Europea. La Food and Drug Administration (FDA), por el momento, no ha autorizado este compuesto.

En medicina humana, está más extendido. Existe tanto en cápsulas orales como en forma inyectable, indicándose en infecciones respiratorias, meningitis, rickettsiosis e infecciones por *H. influenzae* entre otros.

1.5.2. Florfenicol

En Noviembre de 1994, se publicó el Reglamento de la Comunidad Europea (Nº 2701/94) en el que se aprobaba el LMR de florfenicol en la especie bovina. Ese mismo año se aprobó el producto como tal para su uso en la especie bovina y su tiempo de espera en la especie bovina, con la indicación de tratamiento terapéutico de procesos respiratorios en ganado vacuno causados por *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida*. Dos años después, en 1996, se autorizó su registro en Estados Unidos por la FDA (31/5/96) y en Canadá (16/8/96), con la misma indicación. En 1997 sus indicaciones se ampliaron a un nuevo microorganismo *Haemophilus somnus* en la misma especie.

El Síndrome Respiratorio Bovino (SRB) es un complejo multifactorial hoy en día en auge, y está asumido que el ganado bovino es altamente susceptible de sufrir la enfermedad clínica con signos en el tracto respiratorio alto y bajo. Esta patología aparece tras ser sometido a estrés (transporte, cambios de temperatura y falta de hidratación, entre otros). Generalmente una infección viral en el tracto respiratorio alto (Rinotraqueítis infecciosa bovina, IBR; Parainfluenza bovina, PI3) precede a la infección bacteriana, permitiendo que bacterias patógenas (*P. haemolytica*, *P. multocida* o *H. somnus*) colonicen el tracto respiratorio bajo, dando como resultado la aparición de síntomas clínicos patognomónicos de una neumonía aguda cráneo-ventral: pirexia, depresión, descarga nasal purulenta y disnea, que obligan al uso de

antimicrobianos. En los casos en los que no se realizan programas profilácticos de manejo adecuados para prevenir el SRB, es necesario el uso de antimicrobianos para proteger al animal de este proceso, ya que existe un vacío terapéutico en el campo de las sustancias antivirales y la terapia inmunoestimulante.

La susceptibilidad antimicrobiana es un elemento clave a la hora de seleccionar un fármaco eficaz que evite la progresión de la enfermedad. Se tiende a utilizar antimicrobianos de amplio espectro de actividad, como el florfenicol, hasta que los resultados del cultivo y sensibilidad de los microorganismos están disponibles.

Los estudios de sensibilidad realizados sobre pasteurellas de origen bovino (375 cepas tanto de *P. multocida* como de *P. haemolytica*), arrojan una eficacia del florfenicol del 100%, comparada con porcentajes de resistencias del 16,2% para el cloranfenicol o del 53,2% para la estreptomicina (HORSMANSDORFER y BAUER, 1996).

Se han realizado muy diversos estudios clínicos comparativos para demostrar la mayor eficacia del florfenicol frente a otros principios activos utilizados de forma tradicional en la terapéutica de este síndrome. BORDES *et al.* en 1995, publicaron datos de eficacia *in vivo* de florfenicol y amoxicilina. En este estudio incluyeron 87 bovinos enfermos a los que se les controló temperatura rectal, y las tasas de éxito y de fracaso (medidos como fiebre y descarga

nasal), dando unos resultados claramente favorables al florfenicol. Ese mismo año, 1995, DE HAAS llevó a cabo una prueba clínica similar, con 269 bovinos de entre 3 y 9 meses, con síntomas de la enfermedad (SRB). Se repartieron al azar en dos grupos a los que se administró florfenicol y amoxicilina. Sólo un 50% de los animales del grupo amoxicilina fue aceptado como éxito de tratamiento y este porcentaje en el grupo de florfenicol llegó al 85%.

LOOCKWOOD *et al.* llevaron a cabo un estudio, en 1996, comparando la eficacia clínica del florfenicol y la oxitetraciclina. Se partió de 416 animales enfermos (por infecciones de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida*) separados en dos grupos al azar. *In vitro*, todos los aislados (275 de *Pasteurella haemolytica* y 73 *Pasteurella multocida*) fueron sensibles al florfenicol frente a un 29% de sensibilidad en el grupo de la oxitetraciclina. *In vivo*, los resultados de mortalidad del grupo florfenicol fueron del 0,7% frente a un 10,1% en el grupo de la oxitetraciclina. La tasa de recuperación del grupo del florfenicol fue de 79,9% frente al 34,1% en el grupo de la oxitetraciclina (LOOCKWOOD *et al.*, 1996).

Por otro lado, el florfenicol posee, por su espectro de actividad y farmacocinética, el potencial de asumir el papel que ostentaba el cloranfenicol en la terapéutica de las mamitis (LAVY y ZIV, 1991). Se han llevado a cabo otras investigaciones sobre la eficacia del florfenicol en el tratamiento de mamitis clínica y subclínica en la especie bovina, comparada con aquella de la cloxacilina. WILSON *et al.* (1996), realizaron cultivos microbiológicos así

como recuentos de células somáticas pre y post-tratamiento a 156 vacas con mamitis en dos grupos al azar, a las que se administró florfenicol y cloxacilina vía intramamaria. Ambos grupos tuvieron resultados similares, en lo que a tasas de curación se refiere, en el grupo de mamitis clínica (85 casos) y subclínica (71 casos), y en lo que a microbiología se refiere. Las tasas de curación de mamitis fueron de: 63% para *Streptococcus agalactiae*, 9% para *Staphylococcus aureus*, 46% para *Streptococcus* spp., 21% para *Staphylococcus* spp., 46% para *Escherichia coli*, 50% para *Klebsiella* spp.

Hay, además, descritos trabajos sobre la eficacia clínica del florfenicol en el tratamiento de enfermedades entéricas, con resultados similares a los obtenidos con tratamientos a base de la combinación sulfadimidina-baquiloprim (SMITHERMANN *et al.*, 1998).

Está actualmente aprobado su uso en acuicultura en Japón y Corea para el tratamiento terapéutico de infecciones como la pseudotuberculosis causada por *Pasteurella piscicida* y estreptococosis causada por *Streptococcus* spp, concretamente en atún y anguila. Se han obtenido datos similares de aislados obtenidos en Noruega para salmónidos.

KIM y AOKI (1993) determinaron la CMI para 175 cepas de *Pasteurella piscicida* obtenidas de cultivos de tejidos de anguila de diversas zonas de Japón entre los años 1989 y 1991, frente a doce sustancias quimioterapéuticas, hallando hasta un 87% de resistencia al cloranfenicol,

entre otros, en 152 cepas (149 de ellas poseían el plásmido R de transferencia de resistencia al cloranfenicol, kanamicina y tetraciclina). Las 23 cepas restantes resultaron sensibles a: florfenicol, novobiocina, estreptomina, tianfenicol y furazolidona, siendo el florfenicol el agente antimicrobiano de mayor potencia antibacteriana frente a este microorganismo, con un valor de CMI que oscilaba entre 0,004 y 0,6 µg/ml.

En lo referente al tratamiento de las principales patologías en anguila, atún y salmónidos causadas por gérmenes como *Vibrio anguillarum*, *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida*, FUKUI *et al.* (1987) comprobaron la buena actividad *in vitro* del florfenicol frente a cepas resistentes a tianfenicol y cloranfenicol. Estos autores obtuvieron unos resultados *in vivo* semejantes, al administrar los tres fenicoles por vía oral.

SHEPPARD *et al.* (1994) determinaron la eficacia del florfenicol en el tratamiento de la forunculosis en el salmón atlántico, con un descenso en las tasas de mortalidad del 1,45% en los grupos no tratados frente al 0,05% en los grupos tratados. Los aislados de *Aeromonas salmonicida* fueron susceptibles al florfenicol y resistentes a oxitetraciclina, sulfonamidas y eritromicina (SHEPPARD *et al.*, 1994).

En lo referente a la especie porcina, en Méjico, Japón y Corea el florfenicol tiene aprobado su uso en forma de premezcla medicamentosa, en el

tratamiento de la neumonía causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y en diversos países europeos, está aprobado en su forma inyectable para el tratamiento del Síndrome Respiratorio Porcino.

En un estudio realizado por UEDA *et al.* (1995), se inocularon en 65 cerdos, de 5 a 7 semanas de edad, suspensiones que incluían cinco cepas diferentes de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Se les dividió en tres grupos con tratamientos paralelos: florfenicol, tianfenicol y un grupo control no tratado. El 50% de los animales del grupo control murió a los 7 días post-inoculación. No hubo bajas en el grupo tratado con florfenicol y las lesiones pulmonares fueron significativamente menores que las del grupo tratado con tianfenicol y que las del grupo control (UEDA *et al.*, 1995).

HERRADORA y MARTÍNEZ-GAMBA (2003) realizaron un estudio en el que comparan la eficacia de la enrofloxacin y del florfenicol. Inocularon a 42 cerdos suspensiones *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. Se les dividió en tres grupos con tratamientos orales paralelos: florfenicol, enrofloxacin y un grupo control sin tratamiento. En los tres grupos se controlaron la temperatura corporal, los signos clínicos, la secreción nasal y el patrón de respiración. Estos autores no hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos tratados, mostrando la ausencia de resistencias de estos agentes antimicrobianos al patógeno inoculado.

El florfenicol muestra una actividad *in vitro* superior frente a bacterias

patógenas de origen animal que sus análogos estructurales, cloranfenicol y tianfenicol. Además, posee actividad frente a algunas bacterias resistentes al cloranfenicol (NEU y FU, 1980; SYRIOPOULOU *et al.*, 1981). En estos estudios, en los que se utilizaron aislados humanos, NEU y FU (1980), comprobaron que mientras que el tianfenicol mostraba menor actividad frente a todos los aislados cuando se comparaba con el cloranfenicol, el florfenicol mostraba una actividad igual, si no superior, que el cloranfenicol frente a la mayoría de los aislados, incluyendo los resistentes al cloranfenicol. Este grado de actividad se ha confirmado para bacterias de origen animal. Se demostró en cepas de *E. coli* y *S. aureus*, productoras de CAT, que eran inhibidas por el florfenicol, pero no por los otros dos análogos.

VARMA *et al.* (1986) comprobaron la absorción y distribución de florfenicol en tejidos corporales y fluidos, demostrando que el florfenicol penetra en todos los tejidos y fluidos corporales, excepto en cerebro, líquido cefalorraquídeo y humor acuoso, a concentraciones iguales o superiores a las concentraciones séricas. Estos autores abrieron así la posibilidad de su uso potencial en muy diversos procesos infecciosos, por lo que tanto sus especies de destino como sus indicaciones, se ampliarán a otras especies y patologías.

1.6. Toxicidad del florfenicol y sus análogos estructurales

1.6.1. Cloranfenicol

Tras un elevado entusiasmo surgido con el descubrimiento y desarrollo de este agente antimicrobiano y los resultados clínicos obtenidos, en 1950 se comenzaron a conocer diversos informes sobre su hematotoxicidad, detectándose importantes discrasias sanguíneas en la especie humana fueron dos los efectos secundarios observados sobre las células de la médula ósea.

Por un lado, una supresión reversible, dosis dependiente, de la eritropoyesis (en la médula ósea), que ocurre generalmente a concentraciones sanguíneas de cloranfenicol superiores a 25 µg/ml. Esta se debe a la inhibición de la síntesis de las proteínas mitocondriales (BREST, 1967). La supresión de la síntesis de enzimas importantes relacionadas con la membrana mitocondrial, tales como citocromos, finalmente conduce a una inhibición de la respiración mitocondrial y a un cese de la proliferación celular. Este efecto ha podido demostrarse en diversos sistemas de cultivo, como células HeLa (YUNIS, 1973) y médula ósea (RATZAN *et al.*, 1974; YUNIS y GROSS, 1975; MILLER *et al.*, 1980).

Cuando el cloranfenicol se administra a dosis altas, produce a nivel mitocondrial una lesión ultraestructural, que, al igual que la lesión en la

médula ósea, ocurre concurrentemente con la terapia del cloranfenicol, estando directamente relacionada con los niveles séricos del mismo, y es reversible (YUNIS *et al.*, 1970). También ha podido ser demostrada la reversibilidad a nivel mitocondrial *in vitro*, donde se observa una reiniciación del proceso de síntesis de proteínas después de que el fármaco es eliminado por la mitocondria.

Otros parámetros metabólicos en células de mamíferos (síntesis de proteínas ribosomales, y síntesis de ADN, entre otros) son relativamente resistentes al cloranfenicol. Para que ocurra su inhibición, se requieren niveles de 10 a 20 veces los terapéuticos.

El cloranfenicol también inhibe el crecimiento de colonias mieloides humanas y de muridos a concentraciones terapéuticas. Esta inhibición es dosis-dependiente y es completamente reversible con la eliminación del fármaco (YUNIS y GROSS, 1975).

De igual modo, el cloranfenicol inhibe el crecimiento de eritrocitos humanos y de muridos de una manera estereoespecífica, concentración-dependiente. Los mecanismos bioquímicos de la sensibilidad eritrocítica parecen estar relacionados con la inhibición de la síntesis de ferroquelatasa, una enzima mitocondrial asociada a la membrana, y al bloqueo consiguiente de la síntesis del grupo hemo (MANYAN y YUNIS, 1970; MANYAN *et al.*, 1972).

El bloqueo de la síntesis de proteínas a nivel mitocondrial es selectivo (eritrocitos y línea mieloide), existiendo un factor que hace más susceptible al eritrocito, que parece ser el nivel de glicina-serina mitocondrial (aminoácidos claves para la fase de síntesis del grupo hemo).

Los pacientes que ingieren el cloranfenicol, al cabo de dos semanas, y con niveles séricos de 25 a 30 $\mu\text{g/ml}$, presentan trastornos en la maduración de los hematíes. Este trastorno se caracteriza por la aparición en la médula ósea de hematíes con vacuolas y núcleos evidentes, existiendo, además, anemia y reticulocitopenia. Estas anomalías suelen desaparecer cuando cesa la administración de cloranfenicol.

Por otro lado, el cloranfenicol en el hombre puede dar lugar a una complicación más rara, pero de elevada gravedad caracterizada por pancitopenia. El uso del cloranfenicol desencadena una respuesta idiosincrásica dosis-independiente desarrollando una anemia aplásica irreversible (YUNIS y BLOOMBERG, 1964; YUNIS, 1969, 1973, 1986; ROSENKRANZ, 1988). Esta discrasia sanguínea, puede suceder después de semanas, e incluso meses, de haber cesado el tratamiento terapéutico. Este proceso se ha descrito tras administración del cloranfenicol por las vías oral, intramuscular, intravenosa y tópica (ocular).

La anemia aplásica se describió por primera vez por Ehrlich en 1.888. Se caracteriza por una pancitopenia en sangre periférica, hipocelularidad

variable de la médula ósea y ausencia de cualquier proceso mieloproliferativo.

Actualmente estos desórdenes pueden ser congénitos (hereditarios) o adquiridos. Entre el 40 y el 70% de los casos adquiridos son de origen desconocido (idiopático), e incluso en países como Japón este porcentaje llega al 90%, existiendo mayor incidencia en individuos de mayor edad. Entre las causas de este proceso se encuentran: la gestación, las infecciones, las radiaciones, las leucemias y ciertos fármacos.

En el caso del cloranfenicol, el proceso parece estar relacionado con la constitución genética propia de cada individuo. La frecuencia estimada de presentación de la anemia aplásica mortal es de 1/25.000 a 1/60.000 (DEL GIACCO, 1981), frente a una incidencia de 1/58.000 a 1/1,6 millones en individuos no expuestos.

Se demostró que la anemia aplásica provocada por el cloranfenicol no es dosis-dependiente, está ligada a un factor genético (NAGAO y MAUER, 1969), y que, por ello, no existía un modelo animal válido para investigar los mecanismos tóxicos que provocaban este fatal efecto secundario, que se relacionó con el grupo nitro incluido en su molécula.

El grupo p-nitro, al reducirse, desencadena un mecanismo que provoca la inhibición de la síntesis de proteínas en la mitocondria, debido a la formación

en determinados individuos del metabolito altamente citotóxico nitrosocloranfenicol.

Este metabolito del cloranfenicol procedente de la reducción del grupo nitro, puede formarse en el hígado o por la microflora (nitrorreductasa) del tracto gastrointestinal, por acción sobre el radical aniónico del grupo nitro. Este derivado nitroso (WAL *et al.*, 1983), se une covalentemente con el ADN de las células de la médula ósea, siendo esta la principal causa de la aplasia y de la leucemia que sucede después (YUNIS *et al.*, 1980; SKOLIMOWSKI, 1983).

El nitrosocloranfenicol inhibe el crecimiento mieloide de forma irreversible, interrumpe el ciclo celular (provocando una alta tasa de muerte celular), e inhibe la actividad de la ADN polimerasa mitocondrial (YUNIS *et al.*, 1980).

Por otra parte, el cloranfenicol también provoca un efecto inhibitorio sobre las enzimas microsomales hepáticas (HALPERT, 1982).

Existe otra alteración mas, que aparece en niños recién nacidos, tras la administración de cloranfenicol, por su efecto a escala celular con inhibición de la respiración mitocondrial, que provoca un proceso que recibe el nombre de "Síndrome gris". Este proceso se produce como consecuencia de que, en el hígado del recién nacido, no tiene lugar la conjugación del fármaco con glucurónidos (BURNS *et al.*, 1959; FEDER, 1981), encontrándose altos niveles de cloranfenicol sin conjugar.

Desde aquellos hallazgos, se empezó a sopesar la eficacia de este principio activo frente a sus efectos secundarios. Por este motivo, su uso en medicina humana se ha ido restringiendo, para quedar limitado a aquellos casos en que la salud del individuo está seriamente comprometida, y el microorganismo es resistente a otros antimicrobianos indicados en el proceso en cuestión.

En aves, induce efectos tóxicos similares a aquellos causados en mamíferos. Dosis elevadas de cloranfenicol, producen anemia reversible, depresión del Sistema Nervioso Central (SNC) e inapetencia en pollos, pavos y patos, en todos los casos similares a los observados en mamíferos de abasto (RIGDON *et al.*, 1954, 1955; STRAKOVA *et al.*, 1980).

En medicina veterinaria, el cloranfenicol ha sido utilizado en numerosos países de la Unión Europea según se describe en el trabajo publicado por ANADÓN en 1985. Sin embargo a partir del año 1985 se empezó a cuestionar su uso en animales de abasto. En 1985 se prohibió su uso en animales de abasto en Canadá; en 1986 por la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos de América; y en 1994 por la EMEA-CVMP (Committee of Veterinary Medicinal Products) en la Unión Europea, quedó así incluido en el Anexo IV del Reglamento 2377/90/CEE. Hoy en día es un antibiótico no apto para el tratamiento de animales destinados al consumo humano. Su uso, queda, por tanto, reducido para la terapéutica de

animales de compañía.

1.6.2. Tianfenicol

El reconocimiento del papel potencial del grupo p-nitro en la toxicidad del cloranfenicol ha orientado al diseño de compuestos análogos con diversas modificaciones de dicho grupo p-nitro. Entre estos análogos, el tianfenicol, fue evaluado con unos resultados toxicológicos más favorables que el cloranfenicol.

Algunos de los efectos secundarios en el hombre derivados del uso de tianfenicol son la diarrea y las erupciones cutáneas, en ambos casos sin consecuencias clínicas importantes, apareciendo en porcentajes entre 4,2% y 0,2% respectivamente de los pacientes tratados (FERRARI, 1984).

En lo que a alteraciones hematológicas se refiere, y teniendo en cuenta los hallazgos sobre el cloranfenicol, se llevaron a cabo diversos estudios para comprobar si poseía efectos secundarios similares a su predecesor. Se comprobó que el cloranfenicol en tratamientos agudos y crónicos inhibe la motilidad intestinal en múridos (PRAMANIK y MITRA, 1995), disminuyendo el tránsito del alimento, concretamente en el ileon. Este fenómeno se debe al aumento en el ileon de la actividad de los iones de Ca^{++} /ATP-asa dependiente. Este proceso está correlacionado con el grupo p-nitro del cloranfenicol, mediado por una reacción $\text{p-NO}_2\text{-GMP-Ca}^{++}\text{-ATPasa}$, por lo

que no se observa en los otros dos análogos, tianfenicol y florfenicol, al carecer de este grupo.

A priori, y teniendo en cuenta que carece del grupo p-nitro en su molécula, no era esperable que causara anemia aplásica. Sin embargo, ambos compuestos resultaron equipotentes como inhibidores de la síntesis de proteína mitocondrial, ello fue coherente con su potencial capacidad de suprimir la función de la médula ósea.

Se observa, por tanto, que este compuesto desarrolla también casos de discrasias sanguíneas (supresión reversible de la médula ósea) dosis-dependientes, que ocurren sólo durante la terapia. Este efecto está causado por la inhibición de la síntesis de la proteína (YUNIS *et al.*, 1973; KEIZER, 1974).

En contraposición con el cloranfenicol que inhibe la síntesis de ADN a concentraciones superiores 10^{-3} M, el tianfenicol no tiene un efecto similar significativo (YUNIS *et al.*, 1974; FREEMAN *et al.*, 1977). El examen negativo de diversos compuestos análogos al cloranfenicol con diferentes radicales en el grupo p-nitro (MANYAN *et al.*, 1975) sugirió que es este grupo, del que carece el tianfenicol, el que confiere a la molécula de cloranfenicol la capacidad de inhibir la síntesis de ADN.

Otras diferencias entre el tianfenicol y cloranfenicol incluyen una captación

mitocondrial y celular más rápida que la del cloranfenicol, así como una mayor unión covalente intracelular (McLEOD *et al.*, 1977).

Entre los años 1968-1979, se realizó un seguimiento epidemiológico de los pacientes tratados con tianfenicol, y no se informó en ningún paciente casos de anemia aplásica irreversible, confirmándose este hecho en el estudio para tal fin realizado entre los años 1980-1982 con un total de 16 millones de pacientes tratados (YUNIS *et al.*, 1973; FERRARI y PAJOLA, 1981).

1.6.3. Florfenicol

El florfenicol, por su reciente introducción, en la terapéutica veterinaria, y basándonos en los programas de farmacovigilancia y toxicovigilancia dirigidos a este fármaco, no tiene, *a priori*, descritos efectos adversos destacables en lo que respecta a su toxicidad.

El perfil toxicológico del florfenicol queda definido por los ensayos de toxicidad que a continuación se detallan.

1.6.3.1. Toxicidad sobre el sistema reproductor

Con el fin de evaluar la toxicidad de este agente antimicrobiano sobre el aparato reproductor, se realizaron tres estudios en rata. En el primer estudio (BARTON y WILSON, 1989), se comprobó la respuesta de hembras a dosis

de 0, 10, 20, 45 y 60 mg/kg p.c./día, administrando dichas dosis desde 14 días antes de la cubrición hasta el día 14 de la lactación. Los machos no fueron tratados. En todos los casos, las dosis fueron bien toleradas por las hembras. Únicamente la dosis de 60 mg/kg p.c. redujo un 10% la tasa de fertilidad. No hubo efectos observables sobre la progenie a dosis inferiores a 40 mg/kg/día; las dosis superiores tuvieron efectos leves y transitorios.

En el segundo estudio (BARTON y WILSON, 1989), se comprobaron la tolerancia en machos de las mismas dosis administradas durante 12 semanas, desde nueve semanas antes de la cubrición y durante esta. Las dosis superiores a 10 mg/kg p.c. redujeron la fertilidad y dieron como resultado una disminución en el peso de los testículos y epidídimo acompañado de una dilatación y/o decoloración de los mismos.

En el estudio de dos generaciones (BARTON, 1991), se aplicaron dosis de 0, 1, 3 y 12 mg/kg p.c./día, administrándolo desde las 10 semanas previas a la cubrición hasta el sacrificio de las hembras de la F_1 cuando su progenie F_2 se había destetado. En los progenitores de la F_0 , se observó un efecto leve y pasajero sobre el aumento del peso corporal de las madres, así como una influencia en el consumo de agua.

Hubo diferencias en el grupo tratado con 12 mg/kg p.c./día respecto al grupo control:

-en la generación F_1 , la tasa de fecundidad y fertilidad fue ligeramente

inferior, comprobado en la producción de los animales de F_{2B}.

-en la generación F₂, se redujo el peso medio de la camada F_{2A} y el índice de lactación de la camada F_{2B}.

Por otro lado, en el grupo tratado con esa misma dosis (12 mg/kg p.c./día), se comprobó que en la generación F₀ y F_{1B} los pesos de los epidídimos fueron inferiores a los del grupo control. En todos los casos los hallazgos no fueron significativos.

1.6.3.2. Toxicidad embriofetal y teratogenicidad

Se realizaron diversas pruebas en ratón. Las dosis utilizadas fueron de 40, 120 y 400 mg/kg p.c./día, seguidos por 1, 3 y 60 mg/kg p.c./día. En las hembras se observaron efectos moderados a dosis superiores a 200 mg/kg/día. A 400 mg/kg p.c./día se comprobó mortalidad embrionaria anormal, y el peso medio del feto se vio reducido a dosis superiores a 120 mg/kg p.c./día. Se detectaron ciertos retrasos en la osificación a dosis superiores a 40 mg/kg p.c./día, sin embargo no se confirmó en estudios a dosis superiores de 60 mg/kg p.c./día.

Por otro lado, se llevaron a cabo diversas pruebas en rata. Las dosis utilizadas fueron de 0, 4, 12 y 40 mg/kg p.c./día respectivamente. Se detectó toxicidad maternal a dosis superiores a 100 mg/kg p.c./día. Con dosis superiores a 12 mg/kg p.c./día, la ganancia de peso y la ingesta fueron inferiores al grupo control, siendo el consumo de agua superior en el grupo de

prueba.

Referente a la mortalidad embrionaria, en ratas, fue del 100% a dosis superiores a 150 mg/kg p.c./día, y fue ligeramente superior al grupo control en el grupo de dosis superiores a 65 mg/kg p.c./día. Se detectaron, además, alteraciones en la implantación embrionaria a dosis superiores a 40 mg/kg p.c./día. Hubo una reducción del peso medio de los fetos con dosis superiores a 12 mg/kg p.c., así como retrasos en la osificación. No se detectó ninguna malformación a las dosis del ensayo.

La conclusión de los estudios de toxicidad embriofetal y teratogenicidad fueron, por un lado que las dosis más elevadas producen efectos tóxicos maternos severos, que explican la mortalidad embrionaria a dosis inferiores, y por otro que los efectos tóxicos maternos desencadenan retrasos en la osificación, principal efecto observado en los fetos.

Además, el florfenicol no indujo malformaciones fetales a ninguna dosis. Basándonos en estos resultados, se concluye que el florfenicol no posee toxicidad embriofetal ni teratogenicidad específica.

1.6.3.3. Mutagenicidad

El potencial mutagénico del florfenicol se evaluó en profundidad utilizando una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos se realizaron, además,

de forma que se pudiera establecer una comparación entre los efectos genotóxicos del florfenicol y del cloranfenicol.

Se llevaron a cabo ensayos de lesión y reparación en el ADN. Este ensayo se llevó a cabo en hepatocitos de rata utilizando el ensayo de Williams convencional (MYHR y BRUSICK, 1983). No se observó inducción en la reparación del ADN y, por tanto, concluyen que no hubo daño sobre el ADN. A diferencia del cloranfenicol, que sí induce lesión del ADN en los ensayos llevados a cabo (JACKSON *et al.*, 1977).

En relación a los ensayos de mutación génica, por un lado se realizaron ensayos *in vitro* en células procariotas, con dos ensayos de mutación reversa en bacterias (ensayo de AMES) (NODA, 1988). Debido a la actividad antimicrobiana del florfenicol se hizo necesario alterar las condiciones experimentales siendo la concentración más elevada que pudo ser comprobada de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ con una exposición de treinta minutos. Los resultados no demostraron la presencia de mutaciones reversas bajo ninguna condición, tanto con activación metabólica mediante mezcla S9 como sin ella. El valor de estos hallazgos se acepta como limitado debido a que, por la elevada actividad antibacteriana del florfenicol frente a *Salmonella* spp. (CMI generalmente del orden de 4 a 8 $\mu\text{g/ml}$) y frente a *E. coli* (CMI del orden de 1 a 16 $\mu\text{g/ml}$), se hizo necesario hacer comprobaciones con concentraciones inferiores y restringir el tiempo de contacto.

En pruebas similares, el cloranfenicol fue positivo (MITCHELL *et al.*, 1980).

Por otro lado, se realizaron ensayos *in vitro* en células eucariotas, con dos ensayos, en distintos laboratorios, utilizando células de linfoma de ratón L5178K para detectar mutaciones reversas en el locus TK. En ambos casos, el vehículo utilizado fue dimetil-sulfóxido (DMSO) y el ensayo se llevó a cabo con y sin activación metabólica mediante mezcla S9. En el primer estudio se utilizaron concentraciones de florfenicol entre 125 y 4.000 $\mu\text{g/ml}$ (CIFONE, 1983) y en el segundo estudio entre 62,5 y 2.000 $\mu\text{g/ml}$ (YOUNG, 1988).

En ambas condiciones, en presencia y en ausencia de activación metabólica, los resultados fueron negativos; concluyéndose en una ausencia de mutagenicidad por parte del florfenicol.

En lo que a aberración cromosómica se refiere, por un lado se realizaron pruebas *in vitro* en célula eucariota con un ensayo en CHO (Células de Ovario de Hámster Chino) con y sin activación metabólica (LEDDY, 1988). En ausencia de actividad metabólica, no se observó efecto, incluso a la mayor concentración utilizada de 1.250 $\mu\text{g/ml}$. En presencia de actividad metabólica, se observó un efecto de aneuploidia a concentraciones de 1.250 $\mu\text{g/ml}$, que se complicó a concentraciones de 2.500 $\mu\text{g/ml}$ con rupturas cromosómicas. Parece que estos efectos se desencadenaron por el florfenicol a concentraciones superiores a 625 $\mu\text{g/ml}$, concentración determinada como citotóxica; la causa de este efecto podría ser una ralentización de la síntesis

de la proteína mitocondrial de las células inducida por las elevadas dosis que se probaron.

Si tenemos en cuenta que los niveles circulatorios alcanzados con niveles terapéuticos, de pocos $\mu\text{g/ml}$ de suero, que a su vez son muy superiores a aquellos que podrían hallarse en seres humanos que consumen animales con residuos, se concluye que no existe probabilidad de que este efecto pueda suceder en células humanas.

Comparativamente, el cloranfenicol induce lesiones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos a concentraciones de florfenicol inferiores a $100 \mu\text{g/ml}$ (MITUS y COLEMAN, 1970; GOH, 1979). Se han detectado intercambios de cromátidas en cultivos de linfocitos humanos expuestos a concentraciones de $200 \mu\text{g}$ de cloranfenicol/ml (PANT *et al.*, 1976) y roturas cromosómicas a concentraciones de $100 \mu\text{g/ml}$ (SASAKI y TONOMURA, 1973).

Por otro lado, se realizaron ensayos *in vivo* en células eucariotas, con un análisis citogenético utilizando células de médula ósea tibial de ratón (IVETT, 1990), administrando una dosis única y dosis repetidas de florfenicol durante 5 días a dosis de 500, 1.667 y 5.000 mg/kg p.c. respectivamente. Las muestras de médula ósea se tomaron a las 6 horas después de cada administración en cada uno de los tres niveles, así como a las 18 y 30 horas de la administración de una dosis única. No se observaron anomalías cromosómicas en las células examinadas, descartando cualquier duda

surgida con el estudio de aberración cromosómica en células *in vitro* de células eucariotas.

Estableciendo nuevamente la comparación con el cloranfenicol, este último dió resultados positivos, es decir, anomalías cromosómicas a concentraciones de florfenicol de 50 µg/ml en ensayos similares (MANNA y BARDHAN, 1973, 1977).

También en células eucariotas *in vivo*, se realizó un ensayo de micronúcleo en células de médula ósea femoral de ratón (HOLMSTROM, 1988) con una única administración de 5 g de florfenicol/kg p.c., y se observaron a las 24, 48 y 72 horas del frotis de médula ósea. El recuento de micronúcleos no se elevó en los animales tratados y permaneció similar al obtenido en los animales control que recibieron únicamente excipiente.

Como conclusión a los estudios de mutagenicidad y de genotoxicidad, el potencial del florfenicol es muy diferente al del cloranfenicol, del que se ha confirmado en diversos ensayos publicados que daña el ADN, así como que induce mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas. Este comportamiento tan diferente se explica por la ausencia, como ya hemos indicado previamente, del grupo p-nitro en la molécula del florfenicol, grupo este responsable, tras reducción, de la capacidad del cloranfenicol para unirse con los ácidos nucleicos de las células eucariotas. Por tanto, el florfenicol puede considerarse como un compuesto no mutagénico, pues no

induce la activación del sistema de reparación primario de daños del ADN, ni induce mutación génica ni aberraciones cromosómicas.

1.6.3.4. Carcinogenicidad

La estructura de la molécula de florfenicol no tiene, *a priori*, ningún grupo reconocido como fuente potencial de carcinogenicidad. Los estudios de mutagenicidad permiten considerar este compuesto como no genotóxico. Por otro lado, de los estudios realizados sobre toxicidad a dosis repetidas no se vislumbra posible carcinogénesis. Ninguno de los hallazgos en los órganos obtenidos a partir de diversos ensayos (aumento de peso del hígado o riñón), pudieron asociarse a lesiones histopatológicas ni pre-neoplásicas.

Todos los efectos que se han descrito en referencia al sistema hematopoyético fueron dosis-dependientes. Las dosis más altas indujeron depresión de la médula ósea. Sin embargo con las dosis experimentales más próximas a las dosis terapéuticas, únicamente se han descrito efectos transitorios y moderados, limitados a una ligera reducción en la cantidad de hemoglobina, en el número de células rojas y/o neutropenia. En ningún caso, se ha descrito aplasia de la médula ósea. Aquellas alteraciones producidas por altas dosis que afectan a hematíes y al nivel de hemoglobina, se interpretan, por analogía con el tianfenicol, como una consecuencia de los efectos inhibitorios del florfenicol sobre la síntesis proteica mitocondrial, causado por su metabolito ácido oxámico, como en el caso del tianfenicol.

A pesar de lo anteriormente indicado, se realizaron estudios de carcinogenicidad en ratón, durante 24 meses (EVERETT, 1991), y en rata, durante 104 semanas (EVERETT, 1991). En ninguno de ellos se observó un incremento en la incidencia de neoplasias, por encima de lo habitualmente hallado para estas especies ni en comparación con los grupos control.

1.6.3.5. Inmunotoxicidad

En diversos estudios de toxicidad general, se trató de detectar la posible toxicidad sobre el sistema inmunitario. Así, en estudios de dosis repetidas en rata y perro, durante cuatro semanas (PERRY *et al.*, 1987; GREENOUGH y GOBURDHUN, 1987) y en rata y perro durante trece semanas (PERRY, 1990; GOBURDHUN, 1990), se evidenciaron ciertas alteraciones en el recuento de glóbulos blancos, una discreta neutropenia. Este efecto no está relacionado con el sexo y aparece a dosis superiores a 10 mg/kg p.c./día en rata y a partir de 100 mg/kg p.c./día en perro; este efecto sobre los neutrófilos es dosis-dependiente. Estas observaciones se interpretan como una consecuencia de la acción depresora del florfenicol sobre la flora digestiva de los animales, que disminuye la estimulación de sus sistemas de defensa; este es un fenómeno frecuente en este tipo de antimicrobianos.

PAAPE *et al.* (1990) llevaron a cabo estudios en la especie bovina, comparando el efecto tóxico potencial *in vitro* del cloranfenicol, tianfenicol y

florfenicol sobre los neutrófilos, concretamente a tres concentraciones (4.000, 2.000 y 10 µg/ml) para los tres antibióticos. Los efectos se midieron por el porcentaje de fagocitosis y quimioluminiscencia. El cloranfenicol deprimió la fagocitosis a las dosis media y alta, y bloqueó la quimioluminiscencia a la dosis alta. Sin embargo, no se observaron efectos para el tianfenicol y el florfenicol. Por otro lado, se comprobó que con estos dos últimos antibióticos, no se producía alteración de la función de los neutrófilos, aunque sí se modificaba su morfología, en todos los casos en menor medida que con el cloranfenicol (PAAPE *et al.*, 1990).

1.6.3.6. Ecotoxicidad

Las propiedades físico-químicas del florfenicol y sus tres metabolitos llevan a pensar que el compartimento que podría verse afectado con mayor intensidad sería el agua, pues la solubilidad del florfenicol en este medio es de 1,32 mg/ml a pH 7,0. Se realizaron estudios de fotodegradación aeróbica del florfenicol y sus metabolitos, en los que se observó que a pH entre 5 y 7, el agente antimicrobiano florfenicol no se degradaba ante luz natural; pero sí sucedía a pH 9, siendo la florfenicol amina el metabolito de mayor persistencia. Otros autores comprobaron su posible toxicidad en agua frente a diversas algas y trucha arco-iris, mostrando una ausencia de poder algicida; en el caso de la trucha, tampoco hubo muestras de efectos tóxicos.

HEKTOEN *et al.* (1995) estudiaron la persistencia en el medio ambiente,

concretamente en sedimentos marinos, de diversos agentes antimicrobianos: oxitetraciclina, flumequina, sarafloxacin, florfenicol, sulfadiazina y trimetoprim. Para ello, se mezcló sedimento marino con los agentes anteriores y se depositaron en cajas de polietileno en el mar a quince metros de profundidad durante un periodo de tiempo entre 180 y 230 días. Se fueron tomando muestras del sedimento a profundidades entre 1 y 7 cm. La oxitetraciclina y las quinolonas tuvieron una elevada persistencia, a los 180 días quedaban residuos en las capas más profundas. La sulfadiazina y el trimetoprim tuvieron una persistencia media, con un tiempo de desintegración en las capas más profundas de 90 días. Los niveles de florfenicol disminuyeron a gran velocidad, con un tiempo de persistencia en las capas más profundas de 4,5 días (HEKTOEN *et al.*, 1995).

Se puede concluir, por tanto, que el florfenicol a las concentraciones que podrían alcanzarse en el medio ambiente no es lesivo para levaduras, hongos, invertebrados y otras especies acuáticas, siendo su principal medio de depleción la biodegradación aeróbica y la fotólisis.

Evaluados todos estos ensayos de toxicidad, se concluye que el florfenicol posee un amplio margen terapéutico; presenta seguridad de uso a las dosis recomendadas, sin provocar efectos adversos destacables ni constatados en su empleo en medicina veterinaria. Se han descrito durante su uso en clínica práctica, reacciones de hipersensibilidad tras aplicación de florfenicol por vía intramuscular, pero con escasa significación estadística.

1.7. Interacciones medicamentosas de los fenicoles

1.7.1. Cloranfenicol

Encontramos una primera forma de interacción medicamentosa, que es la derivada de la interacción por el lugar de unión donde ejerce la inhibición, es decir, en las subunidades ribosómicas 30S y 50S, donde provoca la inhibición de la síntesis proteica. Sucede entre el cloranfenicol y otros antibióticos bacteriostáticos como los macrólidos (eritromicina, espiramicina y tilosina) (MAZLUM *et al.*, 1985), las tetraciclinas o las lincosamidas (lincomicina y clindamicina). Este fenómeno aparece con mayor gravedad en enfermos con defensas disminuidas. En medicina humana, es también conocido el antagonismo entre el cloranfenicol y la penicilina G en el tratamiento de procesos infecciosos como la meningitis y la endocarditis bacteriana.

El cloranfenicol inhibe la actividad de las enzimas microsomales hepáticas citocromo P450, así, la semivida de eliminación de los fármacos con metabolización hepática (reacciones oxidativas y conjugación con glucurónidos) que se administren simultáneamente, puede tener lugar de forma más lenta que la media, dando como resultado que los efectos farmacológicos observables se prolonguen. Entre estas sustancias se encuentran dicumarol, fenitoína, clorpropamida, tolbutamida y teofilina. En el caso de la tolbutamida (sustancia hipoglucemiante), se produce un incremento de las concentraciones plasmáticas y por tanto, aumenta el efecto

hipoglucemiante. En el caso concreto de la fenitoína, se produce un incremento de su efecto anticonvulsivante, con posible aparición de efectos tóxicos. Este fenómeno ha sido descrito en cánidos (SANDERS *et al.*, 1979).

Si la administración de cloranfenicol se combina con sustancias anticoagulantes, como el dicumarol, la interacción puede desencadenar hemorragias, pues el cloranfenicol disminuye los niveles de protrombina. En ratas, en combinación con cloranfenicol, la teofilina alarga su aclaramiento plasmático hasta un 31%. Esto se debe a la inhibición de los microsomas hepáticos responsables de la oxidación y la demetilación de la teofilina (BUSBY y LESKO, 1987).

Otra forma de interacción medicamentosa que puede afectar al cloranfenicol, sería la derivada de la alteración en la eliminación del cloranfenicol o del otro compuesto al que se asocie. El cloranfenicol prolonga la duración de la anestesia por pentobarbital (principalmente en perros y ratas) (KAYA *et al.*, 1991). Esta prolongación de la anestesia también se produce con anestésicos locales.

Una administración crónica de fenobarbital (fármaco anticonvulsivante), puede derivar, por inducción enzimática, en la necesidad de una subdosificación del antibiótico (POWELL *et al.*, 1985). En gatos, la ketamina (a dosis a partir de 22 mg/kg p.c.), administrada intramuscularmente interacciona con la administración de cloranfenicol (55 mg/kg p.c.)

prolongando el tiempo de la hipnosis (BREE *et al.*, 1975).

Existe una incompatibilidad entre la administración de lasalocid y/o monensina (antibióticos ionóforos, usados en avicultura como coccidiostáticos) y cloranfenicol (MAZLUM, 1985; ANADÓN and REEVE-JOHNSON, 1999). Una interacción similar ocurre en pollos y pavos, en los que provoca alteraciones en el índice de conversión y en el crecimiento, así como síntomas claros de intoxicación (ataxia y parálisis), lo que se comprobó que estaba relacionado con el aumento de los niveles de creatin-quinasa y de transaminasa glutámica oxolacética (GOT) en el plasma, que daban lugar a una miodegeneración (enfermedad del músculo blanco) (BROZ y FRIGG, 1987).

Finalmente, al administrar de forma combinada cloranfenicol y rifampicina (antibiótico tuberculostático), se prolonga la semivida de la rifampicina (BURROWS *et al.*, 1989), lo que requiere un reajuste de la dosificación.

1.7.2. Tianfenicol

El tianfenicol posee el mismo mecanismo de acción que el cloranfenicol. Por ello, una primera forma de interacción medicamentosa es la derivada de la interacción por el lugar de unión donde ejerce la inhibición, esto es, en las subunidades ribosómicas 30S y 50S, donde provocan la inhibición de la síntesis proteica. Esto ocurre, nuevamente, con mayor gravedad en enfermos

con inmunidad disminuida, y sucede con el tianfenicol y otros antibióticos bacteriostáticos como los macrólidos, las tetraciclinas o las lincosamidas.

Como ya hemos mencionado, el tianfenicol es un derivado del cloranfenicol; sin embargo, aunque su absorción y distribución son similares a las del cloranfenicol, el tianfenicol se excreta por la orina de forma inalterada, no por la bilis tras la conjugación hepática, como sucede con el cloranfenicol. Por consiguiente, su eliminación no está influenciada por los procesos patológicos hepáticos ni por el empleo de otros fármacos que son metabolizados a nivel hepático.

En contraposición, y por su perfil metabólico de excreción renal, su eliminación se retrasa en individuos con insuficiencia renal, lo que obligaría a un reajuste de la dosis. El tianfenicol reacciona con el piridoxal y con la piridoxal-5-fosfato formando complejos con enlaces covalentes, alterando el metabolismo de la vitamina B₆ (LAINE *et al.*, 1997). También prolonga la duración de la anestesia por pentobarbital (FREIRE *et al.*, 1997).

1.7.3. Florfenicol

Del mismo modo que el tianfenicol y el cloranfenicol, el florfenicol puede dar lugar a una interacción medicamentosa al administrarse con otros antibióticos bacteriostáticos.

La excreción del florfenicol posee un perfil similar a la del tianfenicol, es decir, se excreta de forma inalterada en elevada proporción por la orina, no por la bilis tras conjugación en el hígado, como sucede con el cloranfenicol. Por consiguiente, su eliminación no está influenciada por las enfermedades hepáticas ni por el empleo de otros fármacos que son metabolizados por el hígado.

En contraposición, y por su perfil metabólico de excreción renal, su eliminación se retrasaría en individuos con insuficiencia renal. En la bibliografía son escasas, hoy por hoy, las menciones relativas a las interacciones medicamentosas del florfenicol; es esperable que vayan apareciendo a medida que se profundice en su estudio cinético y en sus usos terapéuticos.

1.8. Farmacocinética del florfenicol

Dado que el florfenicol ha demostrado tener una mayor actividad *in vitro* que los otros dos fenicoles de estructura análoga, cloranfenicol y tianfenicol, frente a bacterias patógenas implicadas en enfermedades infecciosas comunes de los animales domésticos, la comunidad científica ha visto la necesidad de realizar estudios farmacocinéticos en las especies animales de destino con el fin de seleccionar la dosis terapéutica adecuada, que debe ser confirmada en cada caso por ensayos clínicos. Revisando la literatura en este área, hemos podido constatar estudios farmacocinéticos en las siguientes especies de animales: bóvidos, caprinos, ovinos, équidos, porcino, peces y estudios muy limitados en la especie aviar, objeto esta última de nuestro estudio.

El primer trabajo que describe la farmacocinética del florfenicol fue realizado por VARMA *et al.* (1986) en la **especie bovina**, concretamente en terneros lactantes. Estos autores comprobaron en terneros que el florfenicol tras la administración de una dosis única intravenosa de 22 mg/kg p.v., mostraba que las concentraciones plasmáticas frente al tiempo declinan de forma biexponencial con una fase de distribución rápida con una semivida de distribución ($t_{1/2\alpha}$) de 0,08-0,17 h, y una fase de eliminación también rápida con una semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de 2,29-3,39 h. Sus resultados se ajustan a un modelo abierto bicompartimental. En los diferentes parámetros farmacocinéticos calculados no se observó influencia de la edad de los

animales (VARMA *et al.*, 1986). Estos autores también estudiaron la influencia del alimento en la absorción oral de florfenicol, observando que tras una dosis oral de 22 mg/kg p.v., administrada previo ayuno de los animales durante 12 horas, se alcanza una concentración máxima plasmática (C_{max}) de $11,32 \pm 4,04$ µg/ml en un tiempo (T_{max}) de $0,23 \pm 0,72$ h. Por el contrario, administrando una dosis de 22 mg/kg p.v. en los animales que habían sido previamente alimentados con reemplazantes lácteos, es decir, sin someterles a ningún periodo de ayuno, se obtuvo una C_{max} de $9,41 \pm 1,05$ µg/ml en un tiempo T_{max} $3,36 \pm 0,69$ h.

La biodisponibilidad del florfenicol fue significativamente superior cuando los animales estuvieron sometidos a un periodo previo de 12 horas de ayuno. Esta biodisponibilidad media fue un 88,8% de la dosis administrada; frente al 65% de la dosis administrada en el caso del grupo de animales alimentados previamente (VARMA *et al.*, 1986).

VARMA *et al.* (1986) comprobaron que el florfenicol se excreta en la orina principalmente en forma inalterada. Así, tras su administración intravenosa el 50% de la dosis se elimina vía urinaria como compuesto padre inalterado. Tras su administración oral, el 65% de la dosis de florfenicol biodisponible se eliminó como compuesto inalterado por la orina. Las concentraciones de florfenicol encontradas en la orina fueron muy superiores a las detectadas en suero, encontrándose niveles significativos hasta 30 horas tras la

administración de florfenicol, por lo que este estudio sugiere que el florfenicol sería óptimo para el tratamiento de infecciones urinarias.

Por otro lado en el mismo estudio, VARMA *et al.* (1986) determinaron en terneros el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas. Los porcentajes de unión a proteínas después de la administración intravenosa de florfenicol en terneros era de 21 a 39%. Las concentraciones de florfenicol en las mismas muestras se hallaron entre 2,8 y 12,6 µg/ml.

El segundo trabajo relacionado con la farmacocinética del florfenicol en la especie bovina, corresponde a ADAMS *et al.* (1987), en él describieron la farmacocinética del florfenicol en terneros machos tras la administración de una dosis única de 11 mg/kg p.v. de florfenicol por vía intravenosa, y tras 7 dosis repetidas de 11 mg/kg p.v. de florfenicol por vía oral cada 12 horas (ADAMS *et al.*, 1987).

La cinética de florfenicol en terneros machos tras una dosis única intravenosa de 11 mg/kg p.v. de florfenicol, se ajustó adecuadamente a una ecuación biexponencial con una fase de distribución rápida ($t_{1/2\alpha} = 0,07$ a $0,27$ h) y una fase de eliminación más lenta ($t_{1/2\beta} = 3,45$ a $4,11$ h).

En la administración oral múltiple de florfenicol, 7 dosis en terneros machos, las curvas concentración plasmática-tiempo, se ajustaron adecuadamente a un modelo monocompartimental con una cinética de absorción y una

eliminación de primer orden. Los valores medios calculados para la C_{max} después de la primera y séptima dosis (5,70 µg/ml y 8,18 µg/ml, respectivamente) se correspondieron con la C_{max} media obtenida en el estudio (5,44 µg/ml y 8,31 µg/ml, respectivamente). Los valores medios calculados para el T_{max} después de la primera y la séptima dosis oral administrada (3,64 y 3,38 h, respectivamente) se correspondieron con el T_{max} medio obtenido en el estudio (4 y 3 h, respectivamente). La biodisponibilidad oral calculada fue de un 88% (ADAMS *et al.*, 1987).

En el mismo estudio, ADAMS *et al.* (1987) determinaron las concentraciones tisulares de florfenicol, tras la administración oral a intervalos de 12 horas de 7 dosis de 11 mg/kg p.v. de florfenicol en los tejidos (pulmón, corazón, músculo esquelético, líquido sinovial, bazo, páncreas, intestino delgado e intestino grueso). Estas concentraciones tisulares fueron similares a las correspondientes concentraciones séricas; similitud que indica una buena penetración del florfenicol en estos tejidos y líquidos biológicos. La concentración del florfenicol en estos lugares decreció a lo largo del tiempo en la misma medida que las correspondientes concentraciones séricas, indicando que el florfenicol sufre un rápido equilibrio entre estos tejidos y la sangre. Las mayores concentraciones de florfenicol se encontraron en el riñón y en la orina, confirmando los resultados de VARMA *et al.* (1986). También se encontraron elevadas concentraciones de florfenicol en la bilis, por lo que el florfenicol podría sufrir cierto grado de circulación enterohepática.

Por otro lado, las concentraciones de florfenicol halladas por ADAMS *et al.* (1987) en cerebro, líquido cefalorraquídeo (LCR) y humor acuoso (lugares separados de la sangre por barreras orgánicas bien diferenciadas), estaban en una proporción de 1:4 a 1:2 frente a las correspondientes concentraciones séricas. Las concentraciones en estos tejidos y fluidos no descendieron tan rápidamente, manteniendo un valor bajo, pero aceptable y constante (ADAMS *et al.*, 1987). Así, el florfenicol, aunque en una limitada proporción, atraviesa estas barreras orgánicas.

Es en 1987 cuando, BRETZLAFF *et al.*, publican el tercer trabajo en la especie bovina sobre la farmacocinética y la unión a proteínas de florfenicol, en este caso en vacas de leche durante el periodo seco, así como los efectos sobre la fagocitosis por los neutrófilos sanguíneos. El estudio se realiza tras una dosis única intravenosa de 50 mg florfenicol/kg p.v. Estos autores comprobaron que el florfenicol en vacas de leche tras la administración de una dosis única intravenosa de 50 mg florfenicol/kg p.v. mostró un comportamiento triexponencial para su análisis cinético.

En lo que al nivel de unión a proteínas de florfenicol se refiere, este fue bajo (BRETZLAFF *et al.*, 1987). A pesar de que la unión a proteínas puede afectar de forma significativa al volumen aparente de distribución de un fármaco, el transporte hacia y desde el lugar de acción y degradación, y la eliminación corporal, el significado clínico de una unión débil, como la que se produce en

el florfenicol, es probablemente mínima (CRAIG y WELLING, 1977). El nivel de unión fue independiente de la concentración del fármaco.

En la misma línea de investigación, encontramos el cuarto trabajo publicado en la especie bovina. VARMA *et al.* (1991) estudiaron la farmacocinética y la eficacia del florfenicol en el ganado vacuno adulto tras una dosis única de 20 mg/kg p.v. de florfenicol, vía intravenosa e intramuscular, administrado en una formulación a una concentración de 300 mg/ml (VARMA *et al.*, 1991). Comprobaron que el florfenicol se distribuía ampliamente, con una excelente biodisponibilidad, 77%, por la vía intramuscular y que se eliminaba relativamente rápido, pero a razón menor que el flujo sanguíneo hepático. Los valores medios obtenidos de C_{max} y T_{max} tras su aplicación por esta vía intramuscular fueron 3,21 µg/ml y 3,34 h respectivamente (VARMA *et al.*, 1991).

En 1994, encontramos el quinto estudio en la especie bovina, LOBELL *et al.*, realizaron este estudio sobre la farmacocinética tras la administración intravenosa e intramuscular de una dosis única de 20 mg/kg p.v. de florfenicol en terneros de cebo, utilizando un método HPLC específico y sensible para este compuesto. Los resultados se ajustaron a una ecuación triexponencial para describir la biodisponibilidad del fármaco durante la fase de eliminación, que se caracterizó por una semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de 0,19 a 0,55 h (LOBELL *et al.*, 1994).

En la administración intravenosa de 20 mg florfenicol/kg p.v. en terneros de cebo, los valores de aclaramiento plasmático total (CL) y del volumen aparente de distribución en la fase estacionaria ($V_{d(ss)}$) obtenidos en este estudio fueron comparables a los obtenidos en terneros por VARMA *et al.* (1986) y ADAMS *et al.* (1987). El valor de CL varió de 0,19 a 0,26 L/h/kg. El valor para $V_{d(ss)}$ varió de 0,68 a 0,85 L/kg.

En la administración intramuscular de 20 mg florfenicol/kg p.v. en terneros de cebo, el valor medio de biodisponibilidad sistémica para el florfenicol fue 78,5%, lo que indica buena biodisponibilidad del fármaco. Además, la semivida de eliminación plasmática ($t_{1/2\beta}$) tras la administración intramuscular fue significativamente mayor (18,3 h) que la semivida de eliminación después de la administración intravenosa (2,65 h). La prolongada semivida tras la administración intramuscular de la formulación utilizada en este estudio indica que una lenta liberación del florfenicol desde el punto de inoculación determina su tasa de eliminación del cuerpo. La concentración sérica de florfenicol aumentó lentamente después de la administración intramuscular hasta una C_{max} de 3,21 $\mu\text{g/ml}$ en un T_{max} de 3,34 h (LOBELL *et al.*, 1994).

La unión del florfenicol a proteínas plasmáticas del suero de terneros en este estudio fue 12,7% a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 13,2% a 3,0 $\mu\text{g/ml}$ y 18,3% a 16,0 $\mu\text{g/ml}$ (LOBELL *et al.*, 1994). Estos valores de unión a proteínas son comparables con los valores descritos para terneros (ADAMS *et al.*, 1987) y para vacas adultas (BRETZLAFF *et al.*, 1987).

LOBELL *et al.* (1994) hallaron una relativamente baja unión del florfenicol a proteínas séricas, coherente con su amplio $V_{d(ss)}$ y su extensa distribución en tejidos (ADAMS *et al.*, 1987). El $V_{d(ss)}$ fue aproximadamente igual al volumen del agua corporal total, indicando una unión similar a proteínas séricas y tisulares. El bajo porcentaje de unión a proteínas y la extensa distribución tisular del florfenicol dan idea de su capacidad para llegar a concentraciones clínicas eficaces en los lugares de infección.

El último de los trabajos publicados sobre la farmacocinética del florfenicol en la especie bovina corresponde a SOBACK *et al.* (1995). Analizan la farmacocinética del florfenicol tras la administración intravenosa, intramuscular e intramamaria de 20 mg florfenicol/kg p.v. en vacas durante la fase de lactación. Las curvas concentración plasmática-tiempo se ajustan adecuadamente a un modelo monocompartimental para su análisis cinético, pero la razón $t_{1/2e}/MRT$ de 1,4 demuestra que un modelo multicompartimental podría también describir la cinética del florfenicol. El CL (0,16 L/h/kg) parece ser relativamente lento. El CL en vacas resultó ser ligeramente inferior que en rumiantes jóvenes (VARMA *et al.*, 1986; LOBELL *et al.*, 1994) pero similar a vacas de leche durante el periodo de secado (BRETZLAFF *et al.*, 1987). El $V_{d(ss)}$ fue de 0,35 L/kg (SOBACK *et al.*, 1995), indicando una distribución tisular extracelular, comparable a la de la cefalexina (SOBACK *et al.*, 1988). El $V_{d(ss)}$ en vacas en lactación fue notablemente inferior que el obtenido en

otros estudios en rumiantes (VARMA *et al.*, 1986; BRETZLAFF *et al.*, 1987; LOBELL *et al.*, 1994).

El tiempo medio de residencia (MRT) del florfenicol fue 2,15 h después de la administración intravenosa y 7,4 h después de la administración intramuscular. La $t_{1/2\beta}$ después de la administración intramuscular (12,5 h) fue significativamente más larga que tras la administración intravenosa (3 h), demostrando nuevamente que la absorción es dependiente de la liberación del principio activo desde el punto de inoculación. SOBACK *et al.* (1995) obtuvieron en este estudio una biodisponibilidad del florfenicol tras administración intramamaria de 54%. La biodisponibilidad tras administración intramuscular fue menor, 38% .

Revisada la bibliografía sobre la farmacocinética en la especie bovina, procedemos a describir otras especies. Así, en la **especie caprina**, LAVY *et al.* (1991), estudiaron la farmacocinética del florfenicol en cabras durante el período de lactación, tras administración intravenosa de 25 mg/kg p.v. de florfenicol. Comprobaron que el crecimiento de la mayor parte de los patógenos mamarios Gram-positivos eran inhibidos a concentraciones séricas de florfenicol inferiores a 3,12 $\mu\text{g/ml}$. Para los patógenos Gram-negativos, fueron necesarias concentraciones superiores de florfenicol (LAVY *et al.*, 1991).

Los valores séricos medios de la semivida de distribución ($t_{1/2\alpha}$) tras la

administración intravenosa e intramuscular fueron respectivamente de 2,35 y 3,31 h y el valor de $V_{d(ss)}$ fue próximo a 1,0 L/kg. LAVY *et al.* (1991) comprobaron que este fármaco llega a leche tras la administración intravenosa e intramuscular y se halló aproximadamente una concentración equivalente del fármaco en los cuarterones ordeñados y en los no ordeñados. Las concentraciones de florfenicol en leche se igualaron con las de la sangre, cuando la concentración sérica alcanza el estado estacionario (LAVY *et al.*, 1991).

Recientemente aparece un trabajo realizado por WETZLICH *et al.* (2003) en la **especie ovina**, donde describen que tras administración subcutánea a dosis de 40 mg florfenicol/kg p.v. obtiene una biodisponibilidad de 27%, biodisponibilidad muy baja comparada con la descrita en la especie bovina que es alrededor de 78% aunque tras administración intramuscular (LOBELL *et al.*, 1994). En 2004 JIANZHONG *et al.* describen la farmacocinética y biodisponibilidad en la oveja tras administración de 20 y 30 mg/kg p.v. por vía intravenosa e intramuscular respectivamente. En este estudio tras administración intramuscular obtienen una biodisponibilidad de un 85-89%, resultado más similar al obtenido en la especie bovina. En la oveja, el florfenicol tras administración intravenosa presenta un perfil cinético con una $t_{1/2\alpha}$ de 1,51 h, una $t_{1/2\beta}$ de 18 h, un CL de 0,26L/kg/h y un $V_{d(ss)}$ de 1,86 L/kg (JIANZHONG *et al.*, 2004).

En la **especie equina**, McKELLAR y VARMA (1996) estudiaron la farmacocinética y la tolerancia del florfenicol. Comprobaron que el florfenicol

era bien tolerado tras la administración de una dosis única de 22 mg/kg p.v. de florfenicol por vía intravenosa, intramuscular u oral. Sin embargo, la aparición de heces blandas después de la administración obliga a nuevas investigaciones ante la aparente predisposición del caballo hacia la enterocolitis asociada a antimicrobianos (ANDERSSON *et al.*, 1971; WHITE y PRIOR, 1982). El florfenicol no debería utilizarse en caballos hasta haber realizado estudios de administración a dosis repetidas y confirmar su seguridad en équidos.

McKELLAR y VARMA (1996) obtuvieron en équidos una $t_{1/2\beta}$ de 1,83 horas y un CL de 0,35 L/h/kg. El florfenicol también alcanzó una elevada biodisponibilidad (> 80%) cuando se administró por la vía intramuscular y oral. Los porcentajes de la dosis total de florfenicol excretado de forma inalterada por la orina fueron 13,3% tras la administración vía intravenosa, 7,5% tras la administración vía intramuscular y 5,7% tras la administración vía oral.

Finalmente, entre los trabajos de farmacocinética de florfenicol en mamíferos, también existen en la bibliografía, aunque muy limitados, estudios en la **especie porcina**. UEDA *et al.* (1995) describieron la eficacia del florfenicol en animales de la especie porcina infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, observando que el tratamiento por vía oral da lugar a una escasa biodisponibilidad, por lo que apuntan la necesidad de evaluar formulaciones específicas para esta vía de administración.

También en la especie porcina encontramos un segundo trabajo de VOORSPOELS *et al.* (1999), quienes realizaron un estudio farmacocinético del florfenicol tras la administración de una dosis única de 15 mg florfenicol/kg p.v. por las vías oral e intramuscular. Estudiaron la biodisponibilidad de una formulación (250 mg/kg) administrada por vía oral durante tres días. Estos autores observaron que en ambas vías, oral e intramuscular, se obtenía una biodisponibilidad similar. Los resultados mostraron una gran variabilidad en las concentraciones plasmáticas en los cerdos tras la administración intramuscular y con menor variación en los niveles plasmáticos tras la administración oral. La administración intramuscular y la lenta liberación del fármaco desde el punto de inyección podrían ser los factores responsables de estas variaciones (VOORSPOELS *et al.*, 1999). En cerdos, el florfenicol presenta una $t_{1/2\beta}$ de 14,6 horas tras la administración intramuscular y de 5,5 horas tras la administración oral, lo que indica que el florfenicol se libera lentamente tras la administración intramuscular.

Recientemente, en el año 2003 se publica otro trabajo por LIU *et al.* (2003) sobre la farmacocinética del florfenicol en cerdos sanos y su comparación frente a cerdos infectados experimentalmente con *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Estos autores aplican una dosis única de 20 mg/kg p.v. de florfenicol por las vías intravenosa, intramuscular y oral. La determinación de las concentraciones de florfenicol en plasma se llevaron a cabo por cromatografía líquida de alta resolución. Estos autores comprobaron que las

curvas de concentración plasmática-tiempo del florfenicol en cerdos tras la administración de una dosis única intravenosa de 20 mg/kg p.v. de florfenicol se ajustan adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental para su análisis cinético. Este estudio mostró una rápida fase de distribución ($t_{1/2\alpha} = 0,37$ h) y de eliminación ($t_{1/2\beta} = 2,91$ h). El $V_{d(ss)}$ fue de 1,2 L/kg. Las curvas de concentración plasmática-tiempo se ajustaron a un modelo monocompartimental tras la administración intramuscular y a un modelo bicompartimental tras la administración oral. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en suero tras la administración intramuscular fueron: C_{max} 4,00 $\mu\text{g/ml}$, $t_{1/2\alpha} = 0,12$ h, $t_{1/2\beta} = 13,88$ h y una biodisponibilidad de 122,77%. Tras la administración oral, los parámetros farmacocinéticos obtenidos en suero fueron: C_{max} 8,11 $\mu\text{g/ml}$, $t_{1/2\alpha} = 3,91$ h, $t_{1/2\beta} = 16,53$ h y una biodisponibilidad de 112,9%. LIU *et al.* (2003) no observaron una diferencia estadísticamente significativa entre los perfiles farmacocinéticos del grupo de cerdos sanos frente al grupo de cerdos infectados (LIU *et al.*, 2003).

En el año 2003, JIANG *et al.* también publicaron un trabajo de florfenicol en cerdos tras administración intravenosa, intramuscular y oral a dosis de 20 mg/kg p.v. de florfenicol, en el que los valores de $t_{1/2\beta}$ encontrados tras administración intramuscular fue de 17,8 horas y tras administración oral de 19,28 horas. Así mismo, describieron una biodisponibilidad de 96,86% tras administración vía intramuscular y una biodisponibilidad de 148,53% tras administración vía oral. Estos datos difieren de los encontrados por LIU *et al.* (2003). Los valores altos de biodisponibilidad, podrían estar basados quizás

en que el florfenicol sufre una circulación enterohepática, o bien, que estos datos se obtuvieron con una técnica analítica inadecuada.

Con respecto al metabolismo del florfenicol, no existen en la literatura datos concretos. Sin embargo a través de los estudios realizados por el laboratorio Schering-Plough, que introdujo en el mercado este principio activo, podemos describir que el florfenicol sufre un amplio metabolismo en animales de experimentación (roedores) y en la especie bovina y porcina. En concreto, se determinó que, en la especie bovina, en lo que a depleción de residuos se refiere, y aplicando la pauta posológica aconsejada, 20 mg/kg/día dos dosis, con 48 horas de intervalo entre ambas dosis, había dos principales vías metabólicas del florfenicol. Siendo la mayor parte de la eliminación (75,6%) en los 5 primeros días tras la segunda dosis: 67,4% en la orina (florfenicol 64%; florfenicol amina 8%; florfenicol alcohol 7%; florfenicol ácido oxámico 12% y monocloroflorfenicol <2%) y 8,2% en las heces (principalmente el metabolito monocloroflorfenicol, 29%) (Datos confidenciales recogidos de Schering-Plough, 1991). Después de estos 5 días de fuerte eliminación, se produce una ralentización del proceso metabólico.

En bóvidos, el órgano donde existe mayor concentración de residuos de florfenicol es el hígado y el principal metabolito que se halla es florfenicol amina, que corresponde a un 50% de los residuos totales; en el riñón, el día 5 tras la última dosis, los residuos corresponden principalmente al compuesto inalterado florfenicol, con una concentración de un 75% de los residuos

totales detectados. El día 15 tras la última dosis, el perfil es diferente, los productos extraíbles se han reducido a un 25%, y de ellos, tan sólo un 20% corresponde al compuesto inalterado florfenicol. En músculo, la concentración de residuos es de alrededor del 10% de la hallada en el hígado, siendo el florfenicol el 90% de los residuos hallados en el lugar de inyección. (Datos confidenciales recogidos de Schering-Plough, 1991).

Como conclusión, todos los estudios de metabolismo y depleción de residuos realizados con el florfenicol apuntan un metabolismo que incluye dos fases de biotransformación, derivando ambas en un metabolito principal común, el metabolito florfenicol amina (FIGURA 3):

- una fase metabólica menor: a través de la formación del metabolito monocloroflorfenicol
- una fase metabólica mayor: a través de la formación del metabolito florfenicol alcohol, con o sin la formación del metabolito intermedio, florfenicol ácido oxámico.

Por lo que se refiere a roedores, concretamente ratas, los metabolitos formados son los mismos que en la especie bovina, siendo ambos perfiles similares en las dos especies. Se ha comprobado que tras un régimen de dosificación de 20 mg/kg p.v., dos dosis a intervalos de 48 horas en el día 5 tras la última dosis, el florfenicol se detecta en riñón, 56%, además de en músculo, orina y cantidades traza en heces e hígado. El metabolito florfenicol

amina se identificó en todos los tejidos (27% en hígado). Más de un 50% del florfenicol y de los metabolitos se eliminan en la orina (algo menor que en el ganado vacuno) y alrededor del 30% en heces (ligeramente superior al ganado vacuno). En la rata, se identifican en la excreta los mismos metabolitos y en proporciones similares a lo observado en bóvidos. La única diferencia es con respecto al metabolito florfenicol amina, que en el día 5 tras la última dosis, se elimina principalmente en forma glucuroconjugada, en un 20 y un 39% de los residuos totales, porcentaje que en ganado vacuno es muy inferior. El metabolito monocloroflorfenicol en las heces de la rata supone un 15% frente al 30% en bóvidos. En la rata, al igual que en la especie bovina, es el hígado el órgano dónde persisten los mayores niveles de metabolitos de florfenicol, seguido del riñón (datos confidenciales recogidos de Schering-Plough, 1991).

Las fases metabólicas del florfenicol en la especie porcina tienen un comportamiento similar que el observado en roedores y en bóvidos. La principal vía de excreción es la renal. Los residuos más persistentes se encuentran en riñón e hígado (datos confidenciales recogidos de Schering-Plough, 1991).

Por el momento, se desconocen las fases metabólicas del florfenicol en el caballo y no pueden extrapolarse de la de sus compuestos análogos, ya que el tianfenicol es excretado extensamente de forma inalterada en la mayoría de las especies animales (UESUGI *et al.*, 1974; ABDENNEBI *et al.*, 1985), y

por otra parte, el cloranfenicol es metabolizado ampliamente en hígado, en especial en conjugados glucurónidos (PILLOUD, 1973; UESUGI *et al.*, 1974).

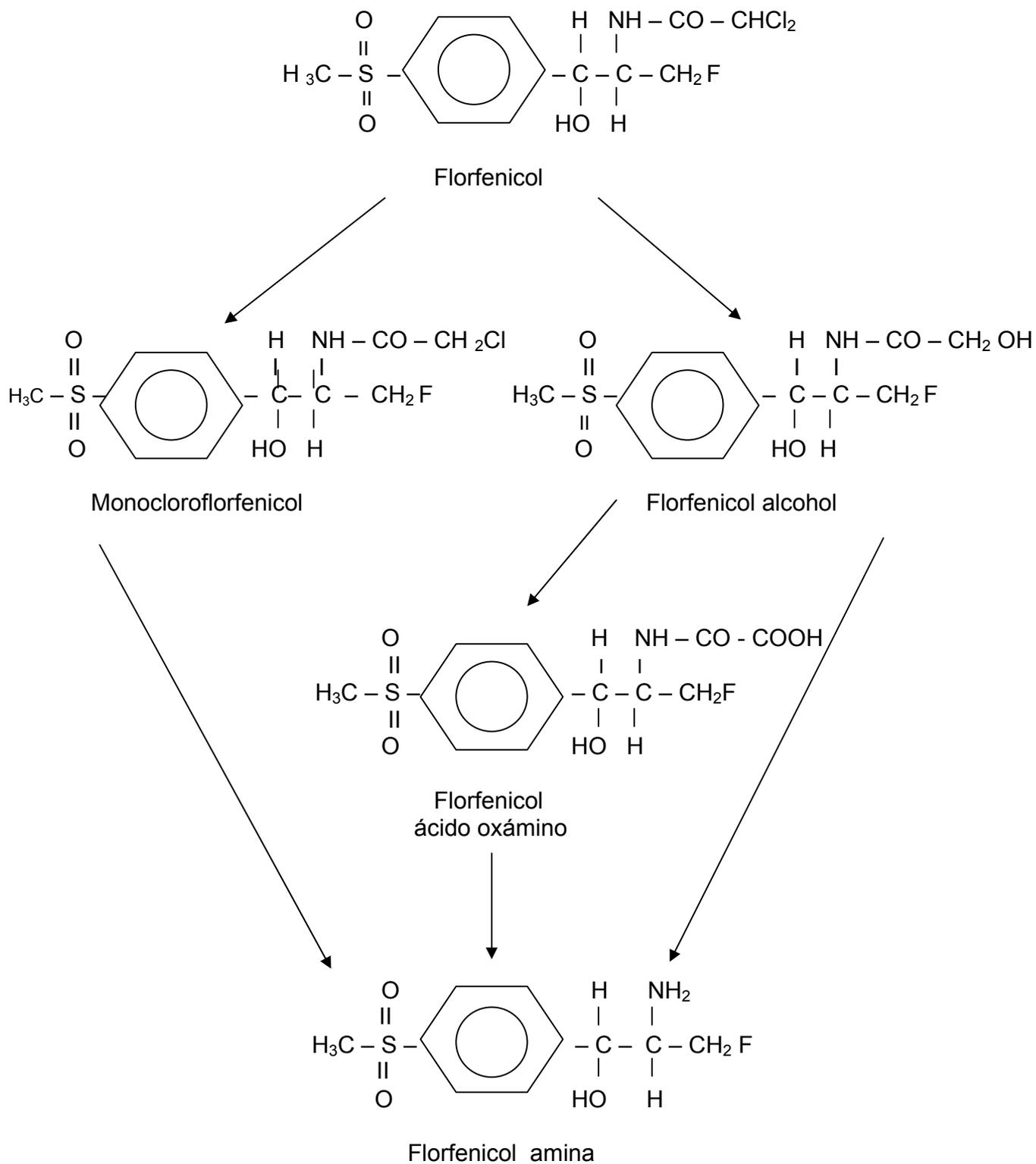


FIGURA 4. Metabolismo del florfenicol.

Años posteriores de llevarse a cabo los primeros estudios de farmacocinética del florfenicol en la especie bovina, en 1993, HORMAZABAL *et al.* iniciaron estudios en **peces**. Su trabajo se enfocó únicamente a la determinación de residuos de florfenicol y su metabolito florfenicol amina en tejidos de peces, determinación que llevaron a cabo por cromatografía líquida. La recuperación de florfenicol en tejido hepático y muscular que obtuvieron estos autores varió entre 99 y 107%, y la recuperación de florfenicol amina en esos mismos tejidos osciló entre 94 y 100%.

Finalmente vamos a revisar los datos existentes en la **especie aviar**, parte importante en relación con el objetivo del presente trabajo de investigación. En especies aviares, los trabajos existentes sobre la farmacocinética del florfenicol son muy limitados y poco sólidos. El primer trabajo descrito en la literatura científica fue el realizado por AFIFI y EL-SOUD (1997). Este estudio utilizó métodos microbiológicos para determinar las concentraciones plasmáticas y tisulares del florfenicol en pollos de engorde o broilers. El método microbiológico tiene el inconveniente de no diferenciar entre metabolitos activos y el compuesto padre. Teniendo en cuenta que los metabolitos son microbiológicamente activos, su presencia, en principio, no tiene por qué interferir con la determinación de un régimen de dosificación terapéutica (SAMS, 1994), pero los parámetros farmacocinéticos obtenidos así como la cinética de depleción de residuos no quedan definidos específicamente para el florfenicol y sus metabolitos.

La cinética del florfenicol en pollos de engorde tras la administración de una dosis única intravenosa de 30 mg florfenicol/kg p.v. se ajustó adecuadamente a una ecuación biexponencial, con rápidas fases de distribución y de eliminación (AFIFI y EL-SOUD, 1997). Estos hallazgos son similares a los descritos por VARMA *et al.* (1986) y ADAMS *et al.* (1987) para ganado vacuno.

Se admite que el $V_{d(ss)}$ es indicativo de su difusión tisular (GILMAN *et al.*, 1980). El florfenicol, mostró en pollos, un elevado volumen de distribución en

el compartimento central (V_c), un elevado $V_{d(ss)}$ y un elevado volumen de distribución en la fase β ($V_{d(are\alpha)}$) con valores de 1,46; 5,11 y 6,47 L/kg, respectivamente (AFIFI y EL-SOUD, 1997). Los valores relativamente superiores de V_c , $V_{d(ss)}$ y $V_{d(are\alpha)}$ indicaron que el florfenicol se distribuye bien a los tejidos (BAGGOT, 1983). Por otro lado, el florfenicol mostró un aclaramiento plasmático muy elevado (1,61 L/h/kg) en pollos (AFIFI y ABO, 1997), resultado muy diferente a lo descrito por LOBELL *et al.* (1994) en terneros (0,26 L/h/kg). Esto puede deberse a variaciones anatómicas y fisiológicas entre las distintas especies animales.

Las curvas concentración plasmática-tiempo de florfenicol en pollos tras una administración única intramuscular y oral de 30 mg/kg p.v. se ajustaron adecuadamente a un modelo monocompartimental. Los valores obtenidos para la C_{max} fueron de 3,82 y 3,20 $\mu\text{g/ml}$ en un T_{max} de 1,67 y 1,05 h tras administración intramuscular y oral, respectivamente (AFIFI y ABO, 1997). Estos resultados están relacionados con los descritos por ADAMS *et al.* (1987) en terneros.

La biodisponibilidad del florfenicol en pollos de engorde o broiler tras administración intramuscular y oral fue elevada, con una absorción de este del 96,6% y 55,3% respectivamente. La semivida plasmática de eliminación tras administración intramuscular fue significativamente más larga que la obtenida tras administración oral, demostrando una lenta liberación y absorción desde el punto de inyección. La biodisponibilidad del florfenicol tras

administración oral indicó que el fármaco pudo ser parcialmente metabolizado y absorbido desde el tracto gastrointestinal y/o que sufre una biotransformación hepática y circulación enterohepática (AFIFI y EL-SOUD, 1997). Si comparamos los resultados del florfenicol obtenidos por estos autores con su compuesto análogo cloranfenicol, ANADÓN *et al.* (1994) demostraron en pollos de engorde o broiler, que la biodisponibilidad del cloranfenicol después de una dosis oral de 30 mg/kg es del 29%, lo que indica una baja absorción a partir del tracto gastrointestinal. La elevada biodisponibilidad del florfenicol (55,3%) obtenida por AFIFI y EL-SOUD (1997) tras su administración oral, y su amplio espectro de actividad frente a patógenos resistentes al cloranfenicol hace pensar que el florfenicol pueda ser un sustituto potencial del cloranfenicol en avicultura. La capacidad del florfenicol de unirse a proteínas plasmáticas en pollos fue 18,5% y 13,3% a concentraciones de 15 y 0,90 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (AFIFI y EL-SOUD, 1997). Estos valores son similares a los descritos para ganado vacuno (ADAMS *et al.*, 1987; LOBELL *et al.*, 1994). La relativamente baja unión del florfenicol a las proteínas plasmáticas está acorde con su elevado $V_{d(ss)}$ (5,11 L/kg).

AFIFI y EL-SOUD (1997) proponen, basándose en sus resultados, que el florfenicol, administrado a una dosis de 30 mg/kg p.v., tenga un período de retirada de, al menos, 4 días para asegurar que el compuesto se haya eliminado de los tejidos, aunque se necesitan posteriores trabajos que demuestren este tiempo de retirada.

El segundo trabajo que ha aparecido en la literatura en el que se estudia la farmacocinética de florfenicol en aves, en este caso en patos, se llevó a cabo en 1998 por EL-BANNA. Este estudio utilizó también métodos microbiológicos para determinar las concentraciones plasmáticas de florfenicol en patos con las mismas desventajas que las anteriormente mencionadas para el caso del estudio de AFIFI y EL-SOUD (1997).

Tras una dosis única de 30 mg florfenicol/kg p.v. vía intravenosa en patos, los resultados mostraron concentraciones plasmáticas menores de florfenicol en los patos enfermos que en los sanos. Esto podría deberse a una distribución extravascular más rápida del florfenicol en los patos enfermos frente a los sanos. Este fenómeno de una rápida y amplia distribución de fármacos antimicrobianos en tejidos de animales enfermos en relación animales sanos fue descrito en trabajos previos realizados en pollos broiler o de engorde para la kitasamicina y el cloranfenicol (SOLIMAN, 1989; ATEF *et al.*, 1991), y en mamíferos para otros antimicrobianos (LADEFOGED, 1979; BAGGOT, 1980).

Los resultados de EL-BANNA (1998) mostraron que las concentraciones plasmáticas-tiempo de florfenicol administrado vía intravenosa en patos sanos y enfermos se ajustan adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental, de acuerdo con los resultados previamente obtenidos en pollos broiler (AFIFI y EL-SOUD, 1997). Las semividas de distribución ($t_{1/2\alpha}$)

(0,22 y 0,25 h) y de eliminación ($t_{1/2\beta}$) (7,42 y 5,22 h) en patos sanos y enfermos, respectivamente, el elevado CL (1,98 frente a 0,61 L/h/kg) y el aumento en el $V_{d(ss)}$ de las aves enfermas (13,19 L/kg) frente a las sanas (5,15 L/kg), en patos sanos y enfermos, respectivamente, está de acuerdo con las bajas concentraciones plasmáticas de florfenicol observadas en los patos infectados con *Pasteurella* spp. (EL-BANNA, 1998). Se han descrito hallazgos similares en pollos de engorde o broiler infectados con *E. coli* y tratados con cloranfenicol (ATEF *et al.*, 1991).

Después de la administración intramuscular de florfenicol, la concentración plasmática media de florfenicol fue significativamente menor en patos enfermos; resultado consistente con una semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) inferior en aves enfermas (5,22 h) comparado con el valor de las aves sanas ($t_{1/2\beta} = 7,42$ h). Las concentraciones plasmáticas máximas de florfenicol en patos enfermos y sanos (3,2 y 1,4 $\mu\text{g/ml}$) se alcanzaron 1 hora tras la inyección intramuscular de florfenicol. Los valores de C_{max} y T_{max} calculados para los patos sanos (2,99 $\mu\text{g/ml}$ y 1,15 h, respectivamente) obtenidos en este estudio (EL-BANNA, 1998) fueron concordantes con los valores obtenidos en pollos de engorde o broiler ($C_{\text{max}} = 3,2$ $\mu\text{g/ml}$ y $T_{\text{max}} = 1,05$ h) por AFIFI y EL-SOUD (1997) tras la administración oral de 30 mg florfenicol/kg p.v. El florfenicol se pudo detectar en la sangre de los patos sanos 24 horas tras la administración de una inyección única intravenosa o intramuscular por encima de la CMI *in vitro* a *Pasteurella* spp. En contraste, estos valores se mantuvieron durante sólo 12 horas en patos infectados con

Pasteurella spp. tras la administración intravenosa o intramuscular. La CMI del florfenicol frente a *Pasteurella* spp. varió entre valores 0,25 y 1 µg/ml (VARMA *et al.*, 1986).

Los resultados presentados por EL-BANNA (1998) mostraron para el florfenicol un valor alto de biodisponibilidad tanto en los patos enfermos (77,16%) como en los patos sanos (73,03%). Sin embargo, se han descrito valores superiores de biodisponibilidad en pollos de engorde o broiler (96,58%) (AFIFI y EL-SOUD, 1997) tras la administración intramuscular de florfenicol.

La capacidad del florfenicol para unirse a proteínas plasmáticas de los animales sanos fue 19,9% a 10 µg/ml y 15,1% a 0,625 µg/ml; y en los animales enfermos fue 25,7% a 10 µg/ml y 16,4% a 0,625 µg/ml (EL BANNA, 1998). Estos valores obtenidos en patos sanos son similares a los obtenidos en pollos de engorde o broiler (AFIFI y EL-SOUD, 1997). El bajo grado de unión a proteínas del florfenicol es coherente con su elevado volumen de distribución en el estado estacionario y su amplia distribución en tejidos.

Estos estudios en ánades, revelaron que la concentración de florfenicol en riñón, hígado y bilis de patos enfermos fue superior a las correspondientes concentraciones plasmáticas, resultados concordantes con los datos de otros antimicrobianos ante estados de enfermedad (BAGGOT, 1980; CAMPOLI *et al.*, 1988; ATEF *et al.*, 1991; ABD EL AZIZ *et al.*, 1996). Estos autores

sugirieron que las alteraciones cardiovasculares asociadas a procesos febriles podrían influir en el aumento de la distribución extravascular.

EL-BANNA (1998) en este estudio en patos y tras administrar una dosis de 30 mg florfenicol/kg p.v., dos veces al día, durante 5 días, observó que los niveles de florfenicol en patos enfermos declinaron con el tiempo y que en el día 7 tras la última dosis no se detectaron niveles en riñón, bilis e hígado. Las concentraciones plasmáticas y tisulares de florfenicol tras la administración intramuscular de 30 mg/kg p.v., 2 veces al día, durante 5 días, se mantuvieron por encima de las concentraciones terapéuticas. Estos autores sugieren que el florfenicol debería someterse a un período de retirada de, al menos, 7 días antes de liberar las canales para el consumo humano para asegurar que el fármaco se ha eliminado de los tejidos.

El tercer trabajo publicado sobre la biodisponibilidad y la farmacocinética de florfenicol en aves, concretamente en pollos broiler, aparece en el año 2003 y corresponde a SHEN *et al.* (2003), quienes estudiaron el comportamiento cinético del florfenicol tras dosis única de 15 y 30 mg/kg p.v. tras administración intravenosa, intramuscular y oral (SHEN *et al.*, 2003). En este estudio (SHEN *et al.*, 2003) se observó en pollos broiler que las concentraciones de florfenicol en plasma tras la inyección intravenosa frente al tiempo declinan biexponencialmente, ajustándose adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental para su análisis cinético, con rápidas semividas de distribución ($t_{1/2\alpha}$) y de eliminación ($t_{1/2\beta}$), resultado acorde con

los obtenidos previamente en pollos broiler (AFIFI y EL-SOUD, 1997) y en ganado vacuno (VARMA *et al.*, 1986; ADAMS *et al.*, 1987). La $t_{1/2\beta}$ de eliminación, 2,8 y 3,02 h, son similares a las obtenidas en pollos broiler ($t_{1/2\beta}$ = 2,88 h, AFIFI y EL-SOUD, 1997), pero muy inferiores a la obtenida en patos ($t_{1/2\beta}$ = 7,17 h) (EL-BANNA, 1998). SHEN *et al.* (2003) al comparar entre los grupos de dosis 15 y 30 mg florfenicol/kg p.v., comprobaron que las áreas bajo las curvas concentración-tiempo (AUC) son proporcionales a las dosis; otros parámetros como V_c , $V_{d(ss)}$, CL, $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$ no demostraron ser dosis-dependientes. Los valores de V_c y $V_{d(ss)}$ fueron mayores que 1 L/kg, lo que indican que el fármaco se distribuye ampliamente en los tejidos. El valor observado para el CL (1,02 L/h/kg) fue algo superior al observado con el compuesto análogo cloranfenicol (0,78 L/h/kg) en pollos broilers (ANADÓN *et al.*, 1994).

SHEN *et al.* (2003) observaron que las curvas concentración plasmática-tiempo tras la administración oral e intramuscular de florfenicol se ajustaron adecuadamente a un modelo monocompartimental para su análisis cinético, resultado acorde con los datos obtenidos previamente para ganado vacuno y caballos (VARMA *et al.*, 1986; ADAMS *et al.*, 1987; McKELLAR & VARMA, 1996). Tras la administración intramuscular y oral, los parámetros farmacocinéticos, $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$ y T_{max} fueron estadísticamente diferentes entre las dosis de 15 y 30 mg florfenicol/kg p.v. La C_{max} fue superior con la dosis mayor, pero el valor encontrado no fue proporcional a la dosis, de acuerdo con los resultados observados con el compuesto análogo cloranfenicol en

pollos de engorde o broiler (ANADÓN *et al.*, 1994).

SHEN *et al.* (2003) también calcularon la biodisponibilidad del florfenicol tras la administración oral e intramuscular de dosis única de 15 y 30 mg/kg p.v. de florfenicol encontrando valores en un rango de 95-97%, valores similares con los resultados observados por AFIFI y EL-SOUD (1997) tras la administración intramuscular (96%), pero mayores que los observados tras la administración oral (55%); esta última discrepancia quizá podría ser debida al periodo de ayuno previo de 12 horas establecido en este estudio.

El cuarto y último trabajo publicado sobre la farmacocinética de florfenicol en aves corresponde a un estudio realizado por SWITALA *et al.* (2003) en pavos tras administración de dosis única de 15 mg/kg p.v. de florfenicol vía intravenosa y oral. Estos autores encuentran una biodisponibilidad oral de 60%; valor similar al obtenido por AFIFI y EL-SOUD (1997) (55%), pero menor que el obtenido por SHEN *et al.* (2003) (95%) en pollos broiler.

Habida cuenta de la limitada información sobre la farmacocinética y depleción tisular de residuos de florfenicol en especies aviares, y dado que es un fármaco potencial en terapéutica aviar, se hacen necesarios mayores estudios completos de cinética junto con estudios clínicos, para situar al florfenicol como un óptimo agente antimicrobiano, alternativo, frente a infecciones comunes respiratorias y entéricas en terapéutica aviar.

1.9. Residuos de florfenicol en productos animales

El uso de medicamentos veterinarios en animales destinados a consumo humano pueden 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 animal, 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 terneza). 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 (ANADÓN *et al.*, 1999; ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

El Reglamento del Consejo 2377/90/CEE de 26 de Junio de 1990 y modificaciones establece un procedimiento comunitario de fijación de los Límites Máximos de Residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Este Reglamento viene desarrollado con posterioridad en distintos Reglamentos de la Comisión Europea (CE) para cada uno de los medicamentos de uso veterinario en animales de abasto. El mismo Reglamento del Consejo define como “LMR” el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (viene expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb sobre la base del peso del alimento de origen animal en fresco), permitido en la Unión Europea (UE). Se han fijados los LMR de un elevado número de principios activos; algunos LMR de ciertos medicamentos son la suma del compuesto inalterado y sus metabolitos activos. Por metabolito se entiende todo producto de biotransformación del principio activo inicial administrado al animal.

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.

Los LMR fijados vienen publicados en Reglamentos de la Comisión Europea haciendo constar:

- sustancia activa farmacológica;
- residuo marcador (compuesto inicial inalterado, o sus metabolitos, o una combinación de ambos);
- especie animal;
- LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- tejido diana (tejido comestible seleccionado para controlar el total de residuos por presentar la menor velocidad de depleción de residuos).

Las sustancias farmacológicamente activas de uso en avicultura y en el resto de especies de abasto, están sometidas en la legislación europea y clasificadas en diferentes Anexos a efectos de fijación de LMR: Anexo I (sustancias farmacológicamente activas para las que se establecen LMR); Anexo II (sustancias que no están sometidas a fijación de LMR); Anexo III (sustancias para las que se establecen LMR provisionales); y Anexo IV (sustancias para las que no se puede establecer LMR ninguno y se prohíbe su comercialización).

Cuando es relevante el LMR, se establece el tiempo de retirada o de espera del fármaco para cada una de las especies animales productoras de alimentos como factor de seguridad que permita cumplir el LMR en el momento de consumo. 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. Deben recogerse datos de depleción

(concentración-tiempo y parámetros farmacocinéticos) de todos los residuos, es decir, residuo total y/o residuo marcador en todos los tejidos comestibles que permitan definir la IDA (ANADÓN y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999). Todo trabajo que implique el estudio de la depleción de residuos para poder establecer el tiempo de retirada debe realizarse aplicando técnicas analíticas que cumplan con todos los criterios de validación definidos en la Decisión de la Comisión de 12 de Agosto de 2002.

La Directiva 2001/82/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 Noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios, define como residuos todas las sustancias activas o sus metabolitos que subsistan en la carne u otros productos alimenticios procedentes del animal al que se haya administrado el medicamento de que se trate. La Directiva 2004/28/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de Marzo de 2004, que modifica la Directiva 2001/82/CEE, define “tiempo de espera” como el periodo de tiempo necesario entre la última administración del medicamento veterinario a un animal, en las condiciones normales de empleo y según lo dispuesto en la presente Directiva, y la obtención de productos alimenticios de dicho animal, a fin de proteger la salud pública, garantizando que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los límites máximos de residuos de sustancias activas fijados de conformidad con el Reglamento (CEE) nº 2377/90.

Son numerosos los estudios de farmacocinética de diversos antimicrobianos en especies de mamíferos de animales de abasto (bovinos y suinos); sin embargo, en relación con 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, el fenicol de primera generación (ANADON *et al.*, 1994); tianfenicol, integrante de la segunda generación (NAGATA y SAEKI, 1991); y del florfenicol, la última generación desarrollada (AFIFI y ABO, 1997; EL-BANNA, 1998; SHEN *et al.*, 2003; SWITALA *et al.*, 2003).

En el caso del cloranfenicol, ANADÓN *et al.* (1994), administraron a pollos de engorde o broiler, vía oral, dos dosis diferentes de 30 y 50 mg cloranfenicol/kg p.v., y vía intravenosa dosis única de 30 mg cloranfenicol/kg p.v. Se obtuvieron a diferentes periodos de tiempo tras la administración muestras tisulares de hígado, riñón y músculo (8 horas, y 1, 2, 6 y 12 días). El análisis de la concentración del cloranfenicol y de sus metabolitos (nitrosocloranfenicol, derivado-base cloranfenicol y dehidrocloranfenicol) en estos tejidos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución. En el día 6 tras la retirada del tratamiento se apreció la presencia de

cloranfenicol en riñón ($0,043 \pm 0,004 \mu\text{g/g}$), en hígado ($0,026 \pm 0,006 \mu\text{g/g}$) y en músculo ($0,43 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$). El día 12 tras la retirada del tratamiento no se detectaron residuos en ninguno de los tejidos analizados (riñón, hígado, músculo) (ANADON *et al.*, 1994). El cloranfenicol está incluido en el Anexo IV, es un fármaco prohibido en animales de abasto. Por el contrario el análogo tianfenicol está incluido en el Anexo I para la especie bovina y avicultura, y en el Anexo III para las especies porcina, ovina y peces.

AFIFI y EL-SOUD (1997) demuestran por métodos microbiológicos, que el florfenicol presenta en pollos broiler una amplia distribución tisular; dosis de 30 mg/kg p.v. de florfenicol originan concentraciones plasmáticas y tisulares eficaces frente a microorganismos patógenos causantes de infecciones aviarias, resultados similares a los obtenidos por SHEN *et al.* (2003). En este estudio AFIFI y ABO (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.. Se obtuvieron muestras tisulares de hígado, corazón, pulmón, bazo, riñón, cerebro, intestino, médula ósea, grasa y músculo, a diferentes tiempos tras el tratamiento: 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 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 ($0,03 \pm 0,003$

µg/g) y en riñón ($0,08 \pm 0,008$ µg/g). Basándose en estos resultados, proponen un tiempo de espera o de retirada de, al menos, 4 días (AFIFI y ABO,1997).

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 aves de puesta 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 µg/kg, es decir 180 µg por persona, y la IDA toxicológica es 10 µg/kg, es decir, 600 µg por persona (tomando para el hombre 60 kg de peso corporal). La EMA ha incluido el florfenicol en el Anexo I con LMRs fijados para las especies bovina, porcina, peces y aves, siendo el residuo marcador el florfenicol más el metabolito florfenicol amina. Los LMR establecidos para aves quedan descritos en la legislación de la UE (EUROPEAN COMMISSION, 1999, 2002).

EMA (2002) recomienda la inclusión del florfenicol en el Anexo I del Reglamento del Consejo (EEC) nº 2377/90 (FIGURA 4).

FIGURA 4. LMR establecidos para aves y resto de especies descritos en la legislación de la UE (EUROPEAN COMMISSION, 1999, 2002).

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	MRL (µg/kg)	Tejido diana
Florfenicol	Suma de florfenicol y sus metabolitos medidos como florfenicol amina	Bovina, ovina, caprina	200 3000 300	Músculo Hígado Riñón

		Porcina	300 500 2000 500	Músculo Piel + grasa Hígado Riñón
		Peces	1000	Músculo y piel en proporciones naturales
		Aves	100 200 2500 750	Músculo Piel + grasa Hígado Riñón
		Todas las especies de abasto, excepto las anteriores	100 200 2000 300	Músculo Grasa Hígado Riñón

1.10. Objetivos del trabajo

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 de engorde o broiler hace que la más mínima infección o retraso en el crecimiento de las aves se traduzca en cuantiosas pérdidas económicas para el criador, lo que vuelve a incidir 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 la Comisión Europea.

Conjuntamente, los estudios de toxicidad marcan la base para el establecimiento del LMR. La EMEA establece los LMR para los medicamentos veterinarios en función de datos toxicológicos relevantes. 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, en avicultura, puede jugar un papel importante 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 de este agente antimicrobiano en otras especies se hace del todo necesario. Este es el caso de las aves, concretamente pollos de engorde o broiler, donde existen escasos datos publicados para establecer el comportamiento farmacocinético del 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 (MELLATA *et al.*, 1998).
- (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 función de todo lo expuesto, la presente memoria tiene por objeto realizar un estudio farmacocinético, incluyendo absorción, metabolismo, distribución y eliminación, y también un estudio de depleción de residuos del nuevo agente antimicrobiano florfenicol, un derivado fluorado del tianfenicol, en pollos de

engorde o broiler, con el fin de obtener datos que puedan ser aplicados en un futuro en el campo de la medicina aviar.

Nuestra investigación va dirigida a definir el perfil farmacocinético y la depleción de residuos del antibiótico florfenicol y de sus principales metabolitos, en la especie aviar, pollo broiler o de engorde, especie destinada a consumo humano. Datos preliminares han sido presentados al 7º y 9º Congresos Internacionales de la “European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT)” (RÍOS *et al.*, 1997; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA *et al.*, 2003).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Protocolo y diseño experimental

En el presente estudio se han utilizado treinta y cuatro pollos broiler (Ross) machos, de 40 días de edad y de 1,8-2,0 kg de peso vivo (p.v.). Los animales fueron obtenidos de la Granja Nutreco, S.A. División Sada, (Cazalegas, Toledo), y una vez en el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (nº Registro 28079-15 ABC-M en la Dirección General de Agricultura y Alimentación, Consejería de Economía y Empleo de la Comunidad Autónoma de Madrid), se alojaron en la zona de experimentación del Animalario, individualmente en jaulas específicas para pollos, 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.

Las condiciones de mantenimiento en la zona de experimentación del animalario fueron constantes, con una temperatura ambiente de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y a $55\pm 10\%$ de humedad. A los animales se les administró agua y alimento *ad libitum*. El alimento utilizado durante la experimentación consistió en pienso específico para pollos de carne en crecimiento, pienso preparado por SANDER S.A. con la siguiente composición: cereales 24%; harina o tortas de oleaginosas 26%; grasas 1%; forrajes deshidratados 4%; compuestos minerales 2%; aglomerantes 1%; corrector mineralo-vitamínico 1%.

Los animales fueron divididos en un total de 3 grupos (grupo 1, ocho pollos; grupo 2, ocho pollos y grupo 3, dieciocho pollos) para ser sometidos a diferentes estudios:

- 1) estudio farmacocinético tras dosis única intravenosa de 20 mg florfenicol/kg p.v.
- 2) estudio farmacocinético tras dosis única oral de 20 mg florfenicol/kg p.v.
- 3) estudio de distribución y depleción tisular tras administración oral de 20 mg florfenicol /kg p.v./día durante tres días.

La dosis correspondiente de florfenicol fue disuelta en un pequeño volumen de glicerol-formol y agua hasta un volumen total de 0,5 ó 2 ml, previo a la administración intravenosa y oral, respectivamente. Específicamente, se realizó la siguiente asignación aleatoria a los tres grupos:

Grupo 1.- Ocho pollos fueron tratados con florfenicol por vía intravenosa a dosis única de 20 mg/kg p.v. La inyección intravenosa se realizó en la vena braquial izquierda. En cada animal, se tomaron muestras sanguíneas (0,5-1 ml) a partir de la vena braquial derecha de 10 min, 20 min, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h después de la administración del fármaco. Las muestras de sangre obtenidas a partir de cada animal, se recogieron en jeringas heparinizadas. El plasma se separó tras centrifugación y se almacenó a

-80°C hasta su posterior análisis y detección de florfenicol y sus metabolitos potenciales.

Grupo 2.- Ocho pollos fueron tratados con florfenicol por vía oral a dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v. La administración oral de florfenicol en los pollos, sometidos previamente a un período de ayuno de 12 horas, se llevó a cabo por intubación gástrica directamente en el buche por medio de una cánula fina de plástico unida a una jeringa. En cada animal, se tomaron muestras sanguíneas a partir de la vena braquial derecha 10 min, 20 min, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h después de la administración del fármaco. Las muestras de sangre (0,5 - 1 ml) obtenidas a partir de cada animal, se recogieron en jeringas heparinizadas. El plasma se separó tras centrifugación y se almacenó a -80°C hasta el análisis y detección del compuesto padre florfenicol y sus metabolitos potenciales.

Grupo 3.- Dieciocho pollos fueron tratados con florfenicol por vía oral a dosis de 20 mg/kg/día durante tres días consecutivos. La administración oral de florfenicol en los pollos, sometidos previamente a un período de ayuno de 12 horas, se llevó a cabo por intubación gástrica directamente en el buche por medio de una cánula fina de plástico unida a una jeringa. Tras el tratamiento se sacrificaron 6 animales por cada uno de los intervalos de tiempo siguientes: 1, 5 y 7 días, tras la última dosis de florfenicol. En cada animal se tomaron muestras de sangre y de los tejidos: músculo, piel + grasa, hígado y riñón. Las muestras tisulares extraídas a partir de cada animal (músculo, piel

+ grasa, hígado y riñón) se almacenaron a -80°C hasta el análisis de la concentración del compuesto padre florfenicol y sus metabolitos potenciales.

2.2. Ensayo analítico de florfenicol y su metabolito en plasma y tejidos

El florfenicol pertenece a un grupo de agentes antimicrobianos sintéticos relacionados por su estructura: cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol. Han sido publicados diversos métodos analíticos para determinar las concentraciones de cloranfenicol en fluidos biológicos y tejidos corporales, que incluyen los microbiológicos (VAN DER LEE, 1982 y SINGER, 1985), utilizando *Micrococcus luteus* (*Sarcina lutea*), que se utilizaban para pruebas de screening para determinación de residuos de cloranfenicol en alimentos de origen animal. Estos ensayos microbiológicos son relativamente sencillos en su realización y de un coste inferior a los métodos físico-químicos. Sin embargo, únicamente miden el fármaco activo, no suelen ser específicos y pueden estar sometidos a interferencias con otros antibióticos. Generalmente es conveniente tras el ensayo, realizar otros posteriores de confirmación.

En la bibliografía se encuentran numerosos métodos físico-químicos, que poseen un alto grado de sensibilidad. Entre ellos encontramos el de WAL *et al.* (1979), con un método de determinación de cloranfenicol por cromatografía de gas, con límites de detección de 0,05 ppm en leche. Este método ha sido ampliamente utilizado para identificación de residuos de

cloranfenicol en leche, huevos y tejidos procedentes de animales productores de alimentos (ALLEN, 1985).

Existen diversas referencias a la cromatografía líquida de alta resolución (KEUKENS *et al.*, 1986; BERRY, 1987; PARKER y SHAW, 1988). Teniendo en cuenta que el uso del cloranfenicol estaba muy extendido y los problemas toxicológicos que pueden desarrollarse en el hombre por toxicidad diferida, existe hoy en día, a pesar de su prohibición, una intensa búsqueda de posibles residuos de este antibiótico en tejidos de origen animal.

Del mismo modo, se encuentran referencias en la bibliografía sobre numerosos métodos analíticos para determinar las concentraciones de tianfenicol en fluidos biológicos y tejidos corporales. Al igual que para el cloranfenicol, para el tianfenicol, se describen métodos microbiológicos (GROVE y RANDALL, 1955; MESTORINO *et al.*, 1993) utilizando *Micrococcus luteus* (*Sarcina lutea*) ATCC 9341, en medios de cultivo de antibiótico número 1 (Difco Laboratories, Detroit, USA).

Por otro lado, se describen otros métodos físico-químicos, que poseen un alto grado de sensibilidad. Entre ellos, encontramos estimaciones mediante colorimetría (AZZOLLINI *et al.*, 1972), y cromatografía de gas (GAZZANIGA *et al.*, 1973). Con cromatografía líquida de alta resolución se han determinado estudios farmacocinéticos para diversas especies de abasto: bovinos (SIGNORINI *et al.*, 1985; SIGNORINI *et al.*, 1986; FELICE *et al.*, 1988,

ABDENNEBI *et al.*, 1994), caprino de leche (LAVY *et al.*, 1991), ovino (ABDENNEBI *et al.*, 1994), piscicultura (OTSUKA *et al.*, 1986; NAGATA y SAEKI, 1992) y aves (NAGATA y SAEKI, 1985, 1991).

En lo referente al análisis del florfenicol, al igual que para sus dos análogos anteriores, existe en la bibliografía descrito un método microbiológico, utilizando *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (AFIFI y EL-SOUD, 1997; EL-BANNA, 1998). Por otro lado, se describen métodos físico-químicos con un alto grado de sensibilidad, para la determinación del florfenicol y su metabolito florfenicol amina en diversas especies. Entre ellos tenemos la cromatografía líquida de alta resolución (VARMA *et al.*, 1985; VARMA *et al.*, 1986; BRETZLAFF, 1986; POWERS *et al.*, 1986; ADAMS *et al.*, 1987; BRETZLAFF *et al.*, 1987; VARMA *et al.*, 1988; LAVY *et al.*, 1991; VARMA *et al.*, 1991; NAGATA y SAEKI, 1992; HORMAZABAL *et al.*, 1993; MARTINSEN *et al.*, 1993; LOBELL *et al.*, 1994; VARMA *et al.*, 1994; HORSBERG *et al.*, 1994; SOBACK *et al.*, 1995; McKELLAR y VARMA, 1996; SHEN *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2003; WEITZLICH *et al.*, 2003), se han realizado estudios farmacocinéticos en especies como bovina, caprina, ovina, equina, peces y aviar.

Tras el estudio de los métodos útiles descritos para la cuantificación de florfenicol y su metabolito florfenicol amina en fluidos biológicos, hemos podido constatar en nuestro laboratorio que la mejor cuantificación fue

obtenida con columna en fase reversa usando un eluyente acidificado que consiste en una mezcla de acetonitrilo, agua y ácido acético.

Según todo lo expuesto, nosotros hemos seleccionado para el análisis de florfenicol y su metabolito en muestras plasmáticas y tisulares el procedimiento de extracción descrito por ADAMS *et al.* (1987), y las condiciones cromatográficas de acuerdo con VARMA *et al.* (1986). Este método de análisis demostró cumplir con todos y cada uno de los criterios de validación de la técnica, linealidad, recuperación, reproducibilidad, repetibilidad, límite de detección y cuantificación y especificidad para el estudio de los niveles de florfenicol y su metabolito florfenicol amina en plasma y tejidos tras dosis terapéuticas de florfenicol (ADAMS *et al.*, 1987; VARMA *et al.*, 1986).

2.3. Procedimiento de extracción y condiciones cromatográficas

El procedimiento de la extracción llevado a cabo fue el siguiente: a las muestras de plasma (0,5 - 1 ml) se les añadió 1 ml de buffer fosfato 0,1M, pH 7,0. Tras mezclarlo bien, se añadieron a continuación 5 ml de diclorometano (cloruro de metileno). Se agitó suavemente por medio de un agitador HEIDOLPH REAX 2000 durante 5 minutos, y seguidamente se centrifugó a 3.000 r.p.m. en centrífuga refrigerada SORWALL, modelo RC-5B, durante 10 minutos. Esta extracción fue repetida tres veces. Las fases orgánicas recogidas y combinadas, se evaporaron a sequedad en baño de agua a una

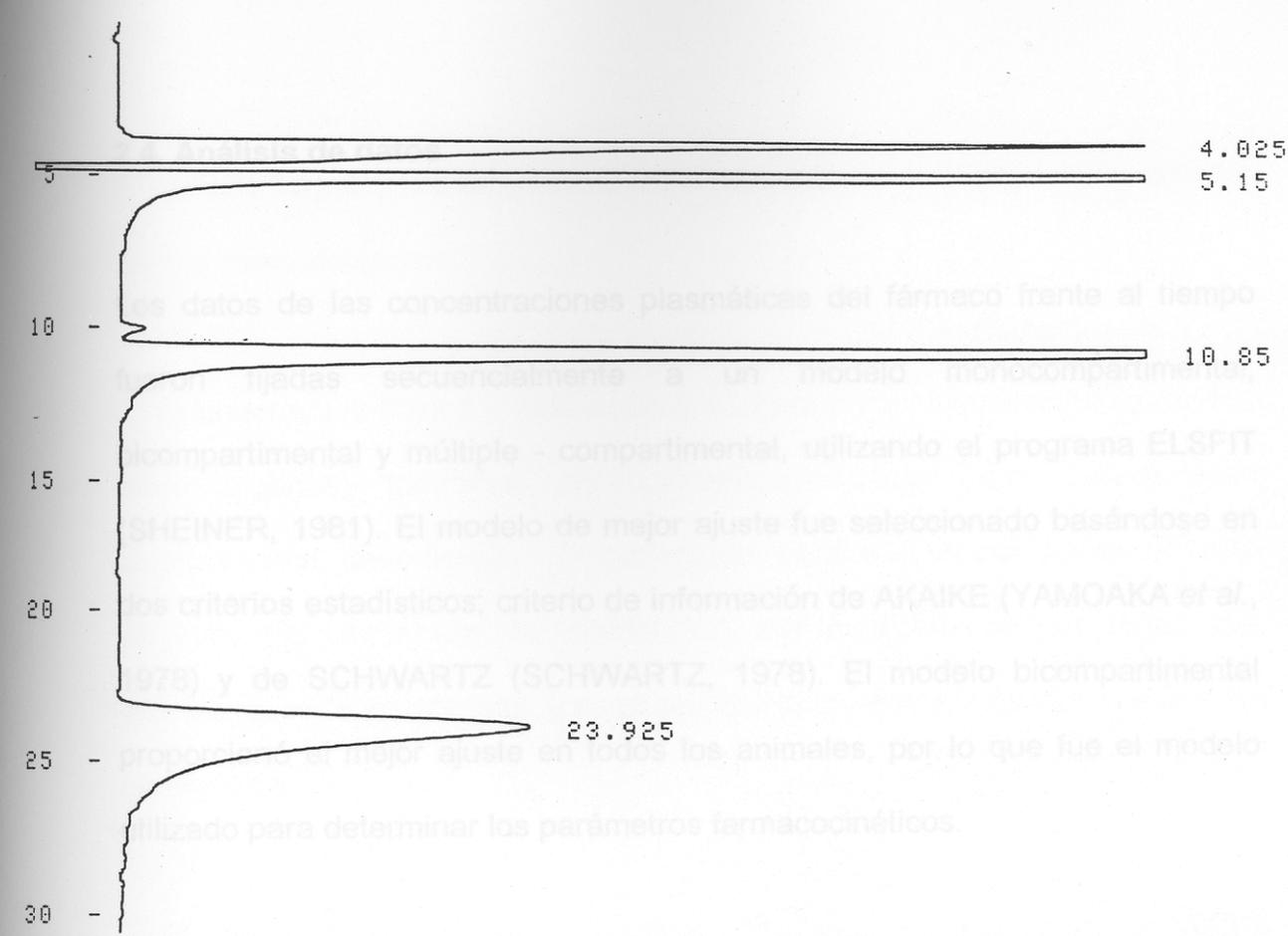
temperatura de 30° C, bajo corriente de nitrógeno. El residuo seco fue disuelto en 0,5 ml del eluyente antes de su análisis por HPLC. Se inyectaron en el cromatógrafo alícuotas de 20 µl.

Las muestras tisulares (1 g) de cada uno de los tejidos se homogeneizaron en 4 ml de buffer fosfato 0,1M, pH 7,0 en frío, por tratamiento ultrasónico en un homogeneizador ultrasónico LABSONIC U, BRAUN 2000. Seguidamente se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se sometió a extracción con diclorometano (10 ml), tres veces, según se ha descrito previamente para las muestras de plasma. Las fases orgánicas recogidas y combinadas se evaporaron a sequedad en baño de agua, a una temperatura de 30°C, bajo corriente de nitrógeno. El residuo seco se disolvió en 0,5 ml del eluyente para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se inyectaron en el cromatógrafo alícuotas de 20 µl.

El sistema cromatográfico líquido de alta presión utilizado para el análisis cuantitativo de florfenicol y su metabolito florfenicol en las muestras plasmáticas y tisulares fue un SHIMADZU, modelo SCL-10A VP, equipado con dos módulos de bombeo de solventes, modelo LC-10AD VP, autoinyector, modelo SIL-10AD VP y detector UV/VISIBLE Photodiode Array modelo SPD-M10A VP, y un sistema de datos cromatográficos software CLASS VP versión 6.1, y una columna cromatográfica (Zorbax ODS) NUCLEOSIL C₁₈ (25 cm x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm). El eluyente o

fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo (250 ml), agua ultrapura (492,5 ml) y ácido acético al 10% (7,5 ml), pH 3,0 ajustado con hidróxido sódico 1N. La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min. La longitud de onda se fijó a 224 nm. La FIGURA 5 recoge un cromatograma con la separación del florfenicol y sus metabolitos florfenicol alcohol, florfenicol ácido oxámico y florfenicol amina.

El método del estándar externo fue empleado para la cuantificación del florfenicol y su principal metabolito florfenicol amina. Para el plasma y los tejidos las curvas estándar para el florfenicol y sus metabolitos fueron lineales de 0,03 a 10 µg/ml. Los coeficientes de variación de los ensayos intra- e inter-día fueron menores 4,8% para el florfenicol y sus metabolitos. El límite de determinación para el florfenicol y su metabolito florfenicol amina fue 0,04 µg/ml en plasma y tejidos. En plasma y tejidos la recuperación media analítica fue 100% para florfenicol y 73% para florfenicol amina. El método utilizado fue específico para todas las sustancias analizadas y no se observó ninguna interferencia con sustancias endógenas propias de los fluidos orgánicos analizados (plasma sanguíneo y tejidos).



CHROMATOPAC C-R6A FILE 5
 SAMPLE NO 0 METHOD 444
 REPORT NO 10834 SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC (µg/20µl)	NAME
1	4.025	927857		1	0.25	FL-OXAMIC
2	5.15	2007211	E	2	0.2523	FL-ALCOHOL
3	10.1	13038				
4	10.85	1598580	SV	3	0.2509	FLORFENICOL
5	12.65	1666	T			
6	23.925	1037263	S	4	0.2584	FL-AMINA
7	27.125	1393	T			
8	27.675	2398	TV			
9	28.575	5065	TV			
10	29.05	3580	T			
11	30	4001	TV			
TOTAL		5602050			1.0116	

FIGURA 5. Cromatograma de la separación del florfenicol y sus principales metabolitos: florfenicol alcohol, florfenicol ácido oxámico y florfenicol amina.

2.4. Análisis de datos

Los datos de las concentraciones plasmáticas del fármaco frente al tiempo fueron fijadas secuencialmente a un modelo monocompartimental, bicompartimental y múltiple - compartimental, utilizando el programa ELSFIT (SHEINER, 1981). El modelo de mejor ajuste fue seleccionado basándose en dos criterios estadísticos, criterio de información de AKAIKE (YAMOAKA *et al.*, 1978) y de SCHWARTZ (SCHWARTZ, 1978). El modelo bicompartimental proporcionó el mejor ajuste en todos los animales, por lo que fue el modelo utilizado para determinar los parámetros farmacocinéticos.

Las curvas de concentración frente al tiempo tras administración intravenosa y oral se fijaron a las siguientes ecuaciones exponenciales:

$$C = A_1 \cdot e^{-\alpha t} + A_2 \cdot e^{-\beta t} \text{ por vía intravenosa}$$

$$C = A_1 \cdot e^{-\alpha t} + A_2 \cdot e^{-\beta t} - A_3 \cdot e^{-k_a t} \text{ por vía oral}$$

donde C es la concentración plasmática, A_1 , A_2 y A_3 , son coeficientes matemáticos a ajustar, α es la constante híbrida para la fase de distribución y β es la constante híbrida para la fase terminal de eliminación y finalmente, K_a es la constante de absorción de primer orden.

El modelo farmacocinético bicompartimental considera al organismo dividido en dos compartimentos:

1) El plasma, los fluidos intersticiales y el agua intracelular asequible (tejidos bien irrigados) formarían un compartimento muy bien caracterizado cinéticamente denominado compartimento central (compartimento N° 1 o central). Por definición, la distribución del medicamento en todos sus elementos sería instantánea, y su concentración uniforme e igual a la existente en el plasma.

2) El agua intracelular profunda (tejidos poco vascularizados) y los depósitos no acuosos (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos intracelulares) se agruparían en un compartimento periférico (compartimento N° 2 o periférico) al que el medicamento accedería más lentamente desde el plasma, de modo que transcurriría un tiempo variable antes de la consecución del equilibrio del medicamento en el total del organismo.

En el seno del compartimento central, se materializan los procesos de eliminación del medicamento por metabolismo y excreción, regidos por una constante de eliminación (K_{10}). Este compartimento canalizaría, además, el proceso de distribución del medicamento al compartimento periférico, regido por la constante de distribución (K_{12}), y, en el caso de que la administración haya sido extravasal, también el proceso de absorción, gobernado por una constante de absorción (K_a).

En el compartimento periférico, desprovisto de mecanismos metabólicos y excretores de importancia, el medicamento permanece depositado pasivamente y su retorno al plasma, regido por la constante de retorno K_{21} , depende del grado de eliminación en el compartimento central y de la afinidad que el medicamento presente hacia los depósitos no acuosos.

Aunque la velocidad de acceso del medicamento a los distintos elementos del compartimento periférico no es la misma y la velocidad de salida tampoco lo es, en la práctica los retrasos en la distribución y en el retorno se consideran aditivos y están cuantificados globalmente por las constantes K_{12} y K_{21} . Del mismo modo, la constante de absorción (K_a) engloba las de liberación y absorción, y la constante de eliminación (K_{10}) engloba a las de metabolismo y excreción.

Se asume que los procesos de absorción, distribución y eliminación asociados con este modelo obedecen a cinéticas de orden uno, es decir, la velocidad en que un fármaco se absorbe y se elimina a partir de un compartimento es proporcional a la concentración en dicho compartimento (FIGURA 6).

Las curvas concentración-tiempo (FIGURA 7), presentado en forma semilogarítmica, demuestra una fase de absorción (1) y una fase de eliminación (2) en la concentración plasmática del fármaco, que principalmente se debe a una distribución (por difusión pasiva) del fármaco desde el compartimento central al compartimento periférico. Una vez que se ha

alcanzado un equilibrio de pseudo-distribución, la velocidad de eliminación en la concentración plasmática se reduce y viene determinada principalmente por la eliminación del fármaco del compartimento central. Esta porción terminal lineal de la curva de disposición se denomina apropiadamente fase β de "eliminación" y a partir de su pendiente ($-\beta / 2,303$) se deriva la semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) del fármaco. Resolviendo la curva de disposición en sus componentes por el método de residuales, se obtienen los segmentos lineales denominados fase de "absorción" y fase α de "distribución" (GIBALDI *et al.*, 1969; WAGNER, 1975, 1976).

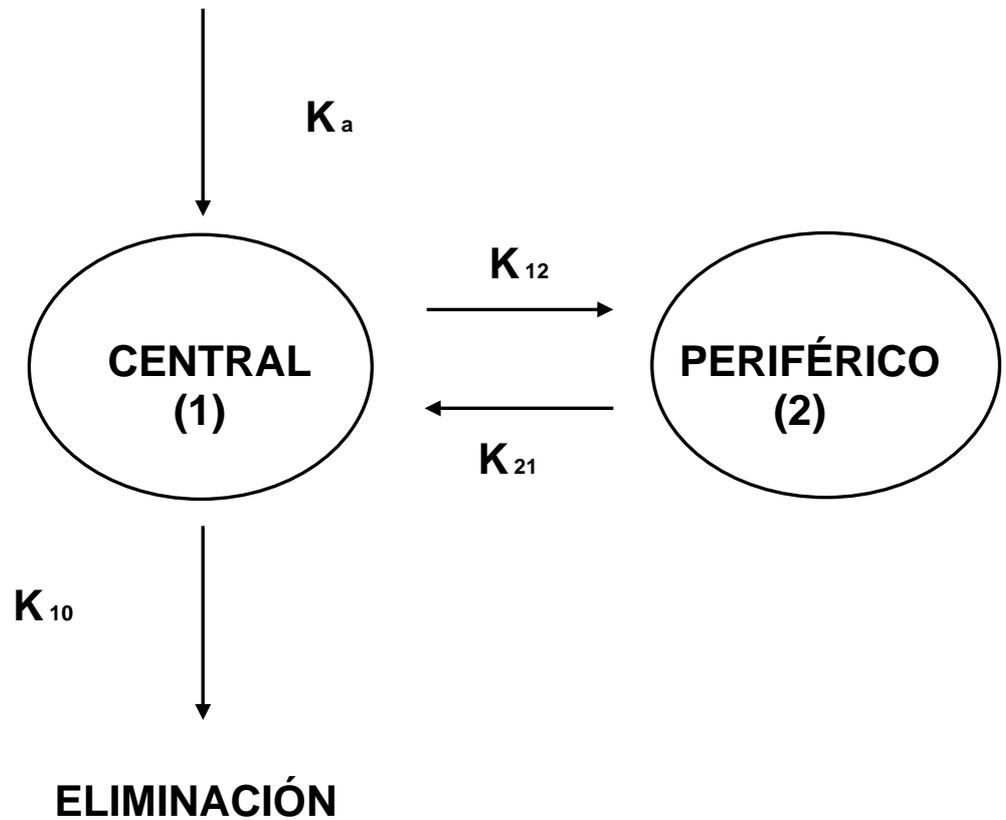
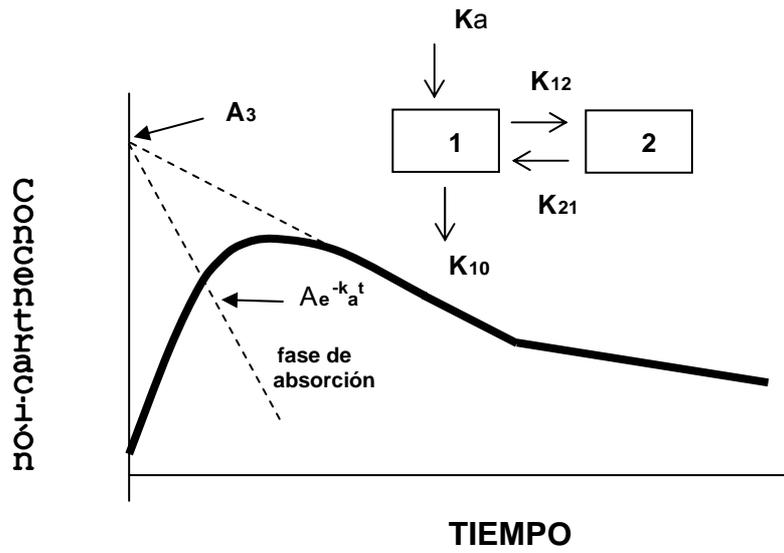


FIGURA 6. Diagrama esquemático de un modelo bicompartimental abierto. El fármaco, una vez en el compartimento central se distribuye instantáneamente. La distribución entre el compartimento central y el compartimento periférico tiene lugar más lentamente; K_{12} y K_{21} son constantes de primer orden para la transferencia del fármaco entre los dos compartimentos. La eliminación se asume que tiene lugar exclusivamente desde el compartimento central; K_{10} es una constante de primer orden para la eliminación del fármaco a partir del compartimento central.

(1)



(2)

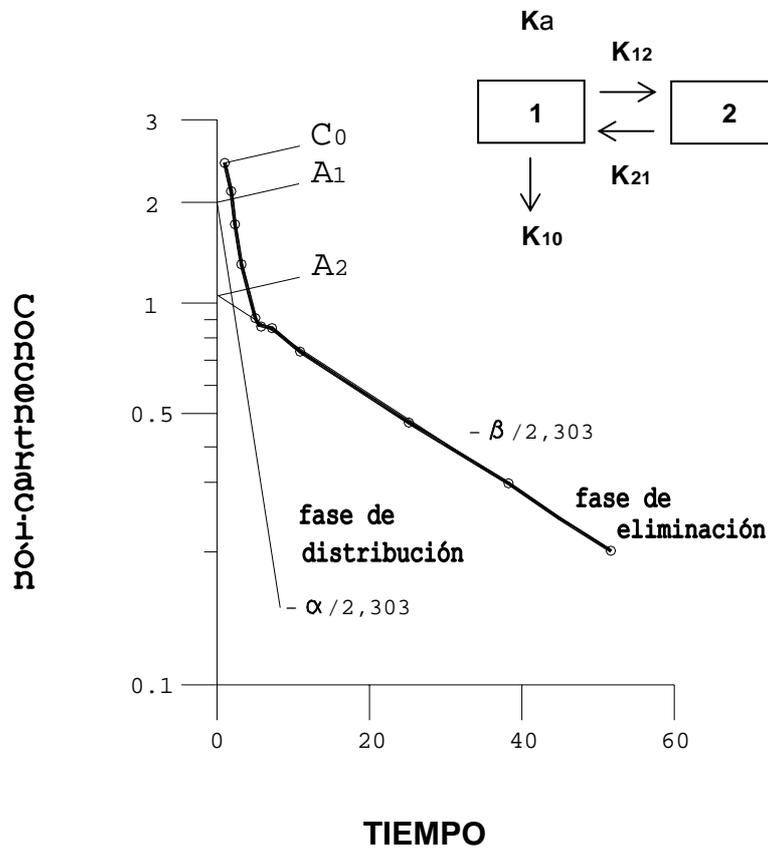


FIGURA 7. Distintas fases de los perfiles de concentración plasmática de un fármaco tras administración de una dosis única oral (1) e intravenosa (2).

En los estudios de disposición, los coeficientes A_1 , A_2 y A_3 las constantes de velocidad α , β y K_a se calculan a partir de datos experimentales por análisis de regresión por mínimos cuadrados y se usan para calcular los diferentes parámetros farmacocinéticos asociados con el modelo bicompartimental, como indicamos a continuación.

Los parámetros farmacocinéticos investigados tras administración intravenosa u oral (WAGNER, 1975, 1976) del fármaco florfenicol fueron:

- A_1 , A_2 , A_3 , concentraciones del fármaco extrapoladas a tiempo 0.
- α y β , constantes de disposición. Ambas son constantes híbridas y respectivamente gobiernan en conjunto los procesos de distribución del medicamento al compartimento periférico, de retorno al central y de eliminación del mismo por biotransformación y excreción.
- K_a , constante de absorción.
- $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$, semividas plasmáticas para la fase inicial de distribución (α) y para la fase terminal de eliminación (β) del proceso, respectivamente.
- $t_{1/2a}$, semivida plasmática

$$t_{1/2a} = 0,693/K_a$$

- **AUC**, área bajo la curva de nivel plasmático

$$\text{Para la vía intravenosa: } AUC = (A_1/\alpha) + (A_2/\beta)$$

$$\text{Para la vía oral: } AUC = (A_1/\alpha) + (A_2/\beta) - (A_2/K_a)$$

- **CL**, aclaramiento plasmático total

$$\text{Para la vía intravenosa: } CL = \text{Dosis}/AUC$$

$$\text{Para la vía oral: } CL = (\text{Dosis} \cdot F)/AUC$$

- **MRT**, tiempo medio de residencia

$$\text{Para la vía intravenosa: } MRT = [(A_1/\alpha^2) + (A_2/\beta^2)]/AUC$$

$$\text{Para la vía oral: } MRT = [(A_1/\alpha^2) + (A_2/\beta^2) + (A_3/K_a^2)]/AUC$$

- **V_c**, volumen aparente de distribución del compartimento central

$$\text{Para la vía intravenosa: } V_c = \text{Dosis}/(A_1 + A_2)$$

$$\text{Para la vía oral : } V_c = (\text{Dosis} \cdot F)/(A_1 + A_2)$$

- **V_{d(area)}**, volumen aparente de distribución para la fase terminal β:

$$\text{Para la vía intravenosa: } V_{d(\text{area})} = \text{Dosis}/(AUC \cdot \beta)$$

$$\text{Para la vía oral: } V_{d(\text{area})} = (\text{Dosis} \cdot F)/(AUC \cdot \beta)$$

- **V_{d(ss)}**, volumen aparente de distribución en el estado estacionario (sólo para administración intravenosa):

$$V_{d(ss)} = MRT \cdot CL$$

- K_{12} , constante de distribución desde el compartimento central al compartimento periférico

$$K_{12} = \alpha + \beta + K_{21} - K_{10}$$

- K_{21} , constante de retorno desde el compartimento periférico al compartimento central

$$\text{Para la vía intravenosa: } K_{21} = (A_1 \cdot \beta) + (A_2 \cdot \alpha) / (A_1 + A_2)$$

$$\text{Para la vía oral: } K_{21} = [(A_1 \cdot \beta \cdot K_a) + (A_2 \cdot \alpha \cdot K_a) - (A_3 \cdot \alpha \cdot \beta)] / [A_1(K_a - \alpha) + A_2(K_a - \beta)]$$

- K_{10} , constante de eliminación

$$K_{10} = (\alpha \cdot \beta) / K_{21}$$

- **VRT**, varianza del tiempo de residencia

$$\text{Para la vía intravenosa: } VRT = 2 \cdot [(A_1/\alpha^3) + (A_2/\beta^3)] / AUC - MRT^2$$

$$\text{Para la vía oral: } VRT = 2 \cdot [(A_1/\alpha^3) + (A_2/\beta^3) + (A_3/K_a^3)] / AUC - MRT^2$$

- **Tmax**, tiempo necesario para alcanzar la Cmax.

- **Cmax**, concentración máxima en plasma tras administración oral.

- **F**, biodisponibilidad oral. La biodisponibilidad oral del florfenicol se calculó por la razón entre el valor de la AUC_{oral} para cada pollo y el valor medio de la $AUC_{\text{i.v.}}$ para los ocho pollos usados en el estudio de administración intravenosa:

$$F = AUC_{\text{oral}}/AUC_{\text{i.v.}}$$

Como existía una pequeña variación individual en $AUC_{\text{i.v.}}$ y ya que los mismos ocho pollos no se utilizaron para el estudio oral e intravenoso, para estimar la biodisponibilidad oral del florfenicol se utilizó la media de la $AUC_{\text{i.v.}}$ para cada pollo.

2.5. Reactivos y fármacos

A continuación mencionamos los reactivos y fármacos utilizados en nuestro trabajo experimental:

- Fosfato monosódico, monohidratado (0,1M)
($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck)
- Fosfato disódico, dihidratado (0,1M)
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
- Ácido acético glacial (CH_3COOH) (Grado HPLC, Scharlau)
- Acetonitrilo (CH_3CN) (Grado HPLC, Scharlau)
- Glicerol-formol ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$) (Sigma)
- Diclorometano (Cl_2CH_2) (Grado HPLC, Scharlau)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (Merck)

Estándares de referencia(*)

- Florfenicol	(C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ FNO ₄ S)	(Schering-Plough)
- Florfenicol amina	(C ₁₀ H ₁₄ FNO ₃ S)	(Schering-Plough)
- Florfenicol ácido oxámico	(C ₁₂ H ₁₆ FNO ₅ S)	(Schering-Plough)
- Florfenicol alcohol	(C ₁₂ H ₁₆ FNO ₅ S)	(Schering-Plough)

(*) El florfenicol y sus metabolitos florfenicol amina, florfenicol ácido oxámico y florfenicol alcohol fueron donados por Schering-Plough Animal Health, Union, New Jersey (EEUU).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Farmacocinética de florfenicol tras administración intravenosa

3.1.1. Niveles plasmáticos de florfenicol tras administración intravenosa

En la TABLA 13 se presentan los niveles plasmáticos de florfenicol obtenidos en pollos de engorde o broiler tras la administración intravenosa a dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v. La FIGURA 8 recoge los niveles plasmáticos medios de florfenicol calculados a partir de ocho animales tras administración intravenosa.

3.1.2. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol tras administración intravenosa

Las concentraciones plasmáticas de florfenicol obtenidas en cada animal tras administración intravenosa de 20 mg/kg p.v., fueron fijadas a un modelo bicompartimental para su análisis cinético. Los parámetros farmacocinéticos fueron obtenidos usando el programa de regresión no lineal de mínimos cuadrados ELSFIT (SHEINER, 1981).

Las curvas plasmáticas de florfenicol - tiempo tras administración intravenosa de florfenicol obtenidas para cada animal, se fijaron a la ecuación exponencial:

$$C = A_1 \cdot e^{-\alpha t} + A_2 \cdot e^{-\beta t}$$

donde **C** es la concentración plasmática de florfenicol, **A₁**, y **A₂** son coeficientes matemáticos; α es la constante híbrida de velocidad para la fase de distribución y β es la constante híbrida para la fase de eliminación terminal, constante de primer orden. Estas ecuaciones fueron elegidas mediante el uso del método estadístico llamado "Minimum Akaike Information Criterion Estimation" (YAMAOKA *et al.*, 1978).

Los valores de los parámetros farmacocinéticos de florfenicol calculados tras la administración intravenosa de 20 mg/kg p.v., se presentan en la TABLA 14, y los parámetros farmacocinéticos medios en la TABLA 15.

Tras la administración intravenosa, el florfenicol se elimina con cierta rapidez del organismo corporal, siendo la semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de $5,36 \pm 1,17$ h. El tiempo medio de residencia (**MRT**) fue de $5,29 \pm 1,75$ h. El valor medio del aclaramiento plasmático total (**CL**) fue de $0,46 \pm 0,09$ L/h/kg.

El florfenicol posee una amplia distribución tisular en pollos broiler. La constante de distribución desde el compartimento central al periférico (**K₁₂**) fue mayor que la constante de retorno (**K₂₁**). El valor medio de la razón **K₁₂ /K₂₁** fue de $8,86 \pm 4,19$. Los valores medios del volumen aparente de distribución para la fase terminal β (**V_{d(area)}**) y el volumen aparente de distribución en el estado estacionario (**V_{d(ss)}**) fueron $3,39 \pm 0,99$ L/kg y $2,34 \pm 0,98$ L/kg, respectivamente.

TABLA 13. Niveles plasmáticos de florfenicol ($\mu\text{g/ml}$) tras administración intravenosa de dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v. a pollos de engorde o broiler.

TIEMPO (horas)	GRUPO 1, (nº de animales = 8)								Valores medios	\pm SD
	1	2	3	4	5	6	7	8		
0,16	31,44	43,46	28,24	51,6	46,6	41,04	39,96	44,2	40,82	7,70
0,33	13,42	15,1	13,04	32,2	18,64	16,24	17,56	17,0	17,9	6,09
0,5	10,24	9,06	8,56	20,24	13,04	13,0	12,24	11,6	12,25	3,65
1	6,02	4,5	5,08	12,24	6,9	6,42	5,96	5,6	6,59	2,40
2	2,56	2,22	2,36	4,24	2,8	2,82	2,64	2,42	2,76	0,63
4	1,6	1,08	1,24	1,88	1,2	1,76	1,3	1,2	1,41	0,29
6	1,3	0,92	1,1	1,5	1,0	1,6	1,12	1,1	1,20	0,24
8	1,2	0,84	0,92	1,3	0,86	1,42	0,96	1,0	1,06	0,22
12	1,1	0,68	0,7	1,0	0,64	1,1	0,72	0,76	0,84	0,19
24	0,34	0,22	0,24	0,34	0,24	0,36	0,24	0,28	0,28	0,06

Figura 8.- Niveles medios plasmáticos de florfenicol tras dosis única intravenosa de 20 mg/kg p.v. en pollos de engorde

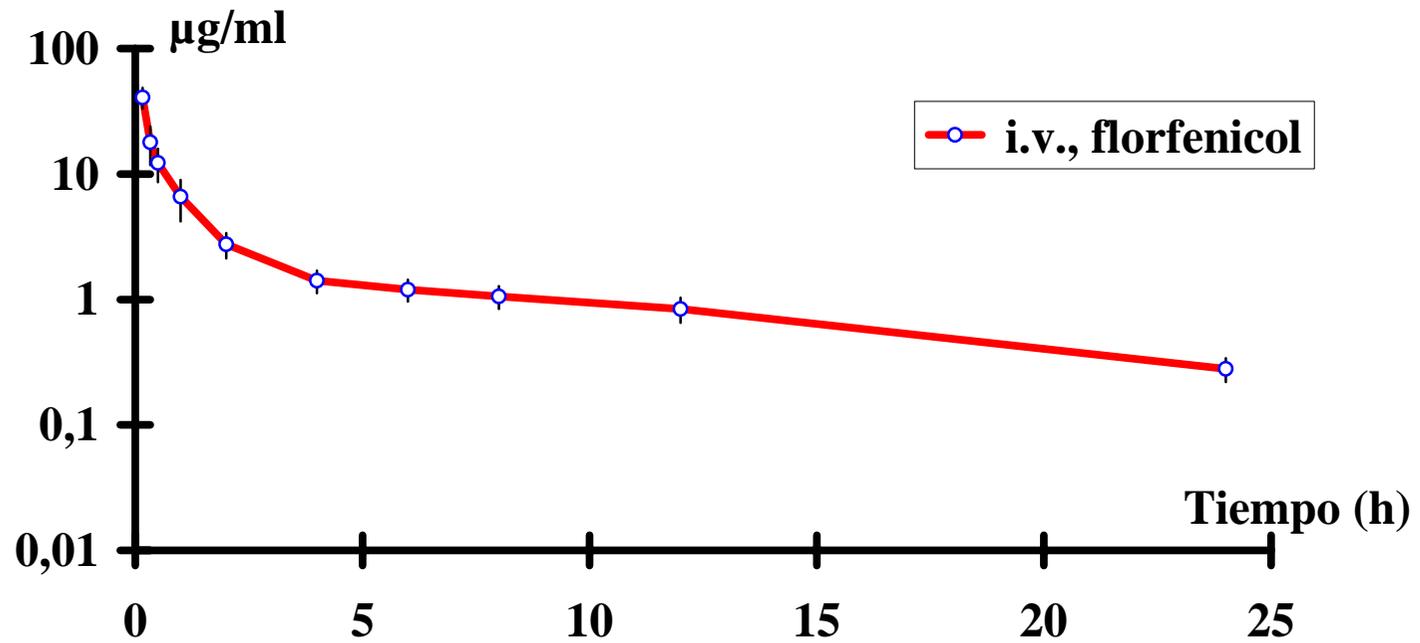


TABLA 14. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol en pollos broiler tras administración intravenosa de 20 mg florfenicol/kg p.v.

Parámetro	GRUPO 1, (nº de animales = 8)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A₁(µg/ml)	17	126,5	60	75	116	118,3	88	114,5
A₂ (µg/ml)	4,1	3,03	3	7	5	4	4	3,5
α (h⁻¹)	6	7	5	3,06	6	7,35	5	6
β (h⁻¹)	0,11	0,12	0,12	0,2	0,19	0,11	0,13	0,11
t_{1/2α} (h)	0,11	0,099	0,14	0,23	0,11	0,094	0,14	0,11
t_{1/2β} (h)	6,3	5,77	5,77	3,46	3,65	6,3	5,33	6,3
V_c (L/kg)	0,95	0,15	0,32	0,24	0,17	0,16	0,22	0,17
V_{d(area)}(L/kg)	4,53	3,85	4,51	1,68	2,31	3,47	3,18	3,57
V_{d(ss)} (L/kg)	4,22	2,27	3,08	1,03	1,36	2,42	2,05	2,26
K₁₂ (h⁻¹)	4,33	3,85	3,06	1,44	3,11	4,78	2,89	3,51
K₂₁ (h⁻¹)	1,25	0,28	0,35	0,44	0,43	0,35	0,34	0,28
K₁₀ (h⁻¹)	0,53	2,99	1,70	1,38	2,65	2,33	1,90	2,32
AUC(mg/h/L)	40,11	43,32	37	59,51	45,65	52,46	48,37	50,90
MRT (h)	8,46	4,92	5,69	3,07	3,10	6,34	4,97	5,74
VRT (h²)	82,04	56,79	61,43	20,04	22,32	74,35	50,65	70,33
CL (L/h/kg)	0,5	0,46	0,54	0,33	0,44	0,38	0,41	0,59
K₁₂/K₂₁	3,45	13,70	8,697	3,24	7,23	13,79	8,44	12,32
K₁₂/K₁₀	8,23	1,29	1,80	1,04	1,17	2,05	1,52	1,51
K₂₁/K₁₀	2,38	0,094	0,21	0,32	0,16	0,15	0,18	0,12

TABLA 15. Parámetros farmacocinéticos medios de florfenicol en pollos broiler tras administración intravenosa de 20 mg florfenicol/kg p.v.

<i>Parámetro</i>	GRUPO 1, (nº de animales = 8)	
	Valor medio	± SD
A₁(µg/ml)	89,41	37,54
A₂ (µg/ml)	4,20	1,30
α (h⁻¹)	5,68	1,34
β (h⁻¹)	0,14	0,04
t_{1/2α} (h)	0,13	0,04
t_{1/2β} (h)	5,36	1,17
V_c (L/kg)	0,297	0,27
V_{d(area)} (L/kg)	3,39	0,99
V_{d(ss)} (L/kg)	2,34	0,98
K₁₂ (h⁻¹)	3,37	1,02
K₂₁ (h⁻¹)	0,47	0,32
K₁₀ (h⁻¹)	1,97	0,78
AUC(mg/h/L)	47,17	7,23
MRT (h)	5,29	1,75
VRT (h²)	54,74	22,97
CL (L/h/kg)	0,46	0,09
K₁₂/K₂₁	8,86	4,19
K₁₂/K₁₀	2,33	2,41
K₂₁/K₁₀	0,45	0,78

3.2. Farmacocinética de florfenicol y su metabolito florfenicol amina tras administración oral de florfenicol

3.2.1. Concentraciones plasmáticas de florfenicol y su metabolito florfenicol amina tras administración oral de florfenicol

En las muestras plasmáticas de los animales tratados con florfenicol a una dosis oral de 20 mg/kg p.v., no se detectaron niveles de los metabolitos florfenicol ácido oxámico y florfenicol alcohol. Sin embargo se detectaron niveles significativos del metabolito florfenicol amina.

Los niveles plasmáticos de florfenicol obtenidos en pollos broiler tras la administración oral a dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v. se presentan en la TABLA 16. Los niveles plasmáticos del metabolito florfenicol amina obtenidos en pollos broiler tras la administración oral a dosis única de 20 mg/kg p.v. de florfenicol se presentan en la TABLA 17. La FIGURA 9 recoge los niveles plasmáticos medios de florfenicol y de su principal metabolito florfenicol amina tras administración oral de dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v., calculados a partir de ocho animales.

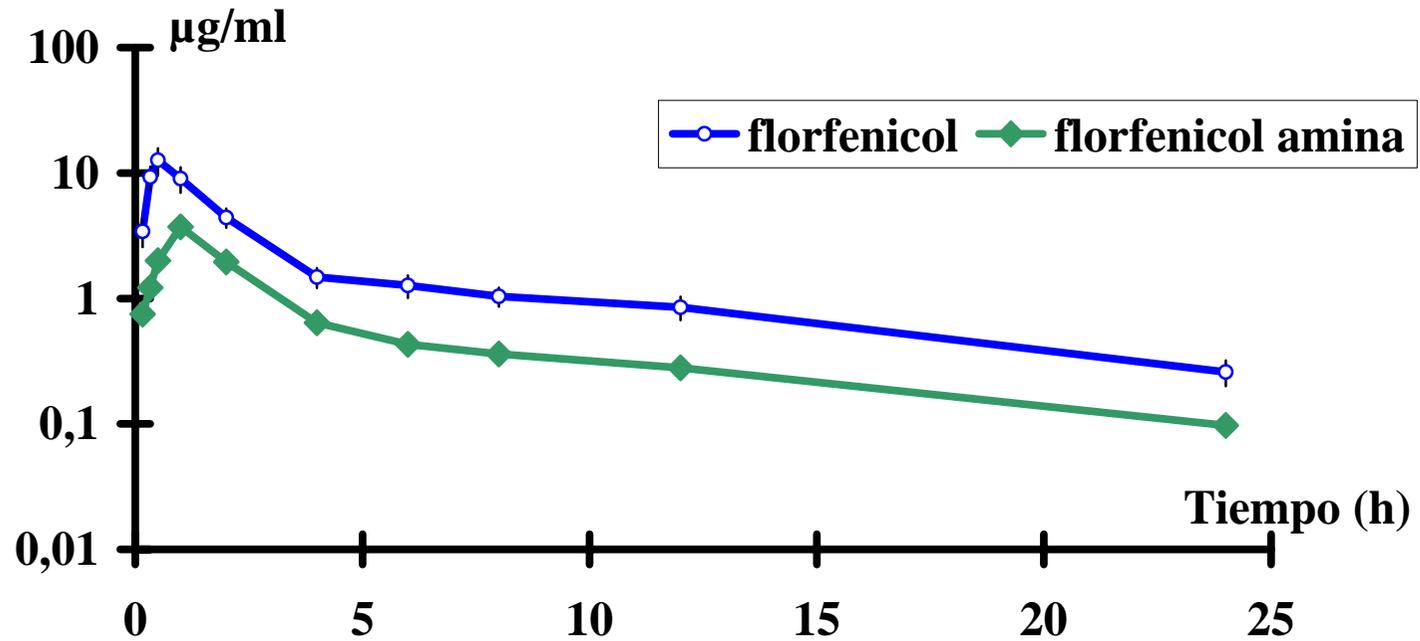
TABLA 16. Niveles plasmáticos de florfenicol ($\mu\text{g/ml}$) tras administración oral de dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v. en pollos de engorde o broiler.

<i>Tiempo</i> (horas)	GRUPO 2, (nº de animales = 8)								Valores medios	\pm SD
	1	2	3	4	5	6	7	8		
0,16	2,4	3,2	2,24	3,6	4,3	4,52	4,06	3	3,42	0,85
0,33	8,36	8,74	6,98	12,32	7,46	9,56	12,06	8,96	9,31	1,96
0,5	13,52	13,7	7,92	15,32	8,36	11,6	16,4	14,12	12,62	3,09
1	7,9	9,4	6,14	8,4	12,08	7,9	12,06	8,5	9,05	2,08
2	4,74	3,96	3,28	3,92	4,58	4,06	5,58	5,34	4,43	0,78
4	1,4	1,32	1,18	1,5	1,22	1,62	1,56	2,02	1,48	0,27
6	1,24	1,14	1,0	1,34	1,02	1,26	1,28	1,84	1,27	0,26
8	1,02	0,92	0,84	1,1	0,9	1,06	1,04	1,42	1,04	0,18
12	0,84	0,76	0,64	0,96	0,74	0,80	0,80	1,24	0,85	0,18
24	0,28	0,20	0,24	0,26	0,22	0,28	0,22	0,40	0,26	0,06

TABLA 17. Niveles plasmáticos de florfenicol amina ($\mu\text{g/ml}$) en pollos de engorde o broiler tras administración oral de dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v.

<i>Tiempo</i> (horas)	GRUPO 2, (nº de animales = 8)								Valores	\pm SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	medios	
0,16	1,20	0,38	0,45	0,63	1,10	0,90	0,53	0,80	0,75	0,30
0,33	1,80	0,60	0,90	1,18	1,70	1,30	0,80	1,50	1,22	0,43
0,5	2,15	1,82	2,20	2,40	2,20	1,80	1,05	2,39	2,00	0,45
1	3,96	3,80	4,12	4,03	3,98	4,10	2,80	3,05	3,73	0,51
2	2,03	1,80	2,20	1,90	1,80	2,15	2,20	1,60	1,96	0,22
4	0,61	0,70	0,75	0,68	0,65	0,50	0,70	0,50	0,64	0,09
6	0,50	0,40	0,45	0,37	0,38	0,41	0,60	0,34	0,43	0,08
8	0,42	0,34	0,38	0,32	0,31	0,35	0,50	0,28	0,36	0,07
12	0,32	0,24	0,31	0,22	0,22	0,28	0,40	0,22	0,28	0,06
24	0,11	0,085	0,10	0,082	0,092	0,09	0,13	0,09	0,097	0,02

Figura 9.- Niveles medios plasmáticos de florfenicol y de su metabolito florfenicol amina tras dosis única oral de 20 mg florfenicol/kg p.v. en pollos de engorde



3.2.2. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol y su metabolito florfenicol amina tras administración oral de florfenicol

Las concentraciones plasmáticas de florfenicol y de su metabolito florfenicol amina frente al tiempo obtenidas en cada animal tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v., fueron adecuadamente fijadas a un modelo bicompartimental para su análisis cinético. Los parámetros farmacocinéticos fueron obtenidos usando el programa ELSFIT de regresión no lineal por mínimos cuadrados (SHEINER, 1981). Las curvas plasmáticas de florfenicol y de su metabolito florfenicol amina tras administración oral de florfenicol obtenidas para cada animal, se ajustaron a la siguiente ecuación exponencial:

$$C = A_1 \cdot e^{-\alpha t} + A_2 \cdot e^{-\beta t} - A_3 \cdot e^{-k_a t}$$

donde **C** es la concentración plasmática de florfenicol, **A₁**, **A₂** y **A₃** son coeficientes matemáticos; α es la constante híbrida de velocidad para la fase de distribución; β es la constante híbrida para la fase de eliminación terminal y **K_a** es la constante de velocidad de absorción, constante de primer orden. Esta ecuación fue elegida mediante el uso del método estadístico llamado "Minimum Akaike Information Criterion Estimation" (YAMAOKA *et al.*, 1978).

Los valores de los parámetros farmacocinéticos de florfenicol en pollos broiler, calculados tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v. se representan en la TABLA 18. Y los parámetros farmacocinéticos medios en la TABLA 19.

Los valores de los parámetros farmacocinéticos del metabolito florfenicol amina en pollos broiler, calculados tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v. se representan en la TABLA 20. Y los parámetros farmacocinéticos medios en la TABLA 21.

Tras la administración oral de florfenicol, se observó que el fármaco fue rápida y ampliamente absorbido, obteniéndose un valor medio de la semivida plasmática de absorción ($t_{1/2a}$) de $0,16 \pm 0,06$ horas, alcanzándose la concentración máxima (**Cmax**), $10,50 \pm 1,80$ $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (**Tmax**) de $0,46 \pm 0,09$ h. La biodisponibilidad oral (**F**) de florfenicol fue $78 \pm 11\%$ de la dosis administrada.

El florfenicol tras administración oral de 20 mg/kg p.v. presenta una amplia y rápida distribución tisular en pollos broiler. Con una semivida de distribución ($t_{1/2\alpha}$) de $0,64 \pm 0,08$ h. La constante de distribución desde el compartimento central al periférico (**K₁₂**) fue mayor que la constante de retorno (**K₂₁**), al igual que cuando se administró intravenosamente. El valor medio de la razón **K₁₂** /**K₂₁** fue de $2,49 \pm 0,37$. El valor medio del volumen aparente de distribución para la fase terminal β (**V_{d(area)}**) fue $4,99 \pm 0,42$ L/kg, tras administración oral.

El florfenicol tras su administración oral es eliminado más lentamente del organismo que tras su administración intravenosa, con una semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de $8,17 \pm 0,68$ h frente a la semivida de eliminación tras el tratamiento por vía intravenosa ($5,36 \pm 1,17$ h). Esto podría sugerir la existencia de una circulación enterohepática.

Como se esperaba el florfenicol sufre una amplia biotransformación en el organismo corporal. Tras la administración oral de florfenicol, la concentración plasmática máxima (**C_{max}**) encontrada del metabolito florfenicol amina fue de $2,59 \pm 0,34 \mu\text{g/ml}$ y se alcanzó a las $0,93 \pm 0,16 \text{ h}$ (**T_{max}**) (TABLA 21). La semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) del metabolito florfenicol amina fue de $9,04 \pm 0,73 \text{ h}$, semivida algo más prolongada que la del compuesto inalterado florfenicol.

El metabolito florfenicol amina representó un 35% de la concentración plasmática de florfenicol, porcentaje calculado por la razón entre el valor medio del área bajo la curva de concentración-tiempo (**AUC**) para el metabolito florfenicol amina y el valor medio del área bajo la curva de concentración-tiempo (**AUC**) para el florfenicol tras la administración oral de florfenicol. Los otros metabolitos (florfenicol alcohol y florfenicol ácido oxámico) no fueron detectados en plasma.

El metabolito florfenicol amina se distribuye ampliamente a nivel tisular. La constante de distribución desde el compartimento central al periférico (**K₁₂**) fue mayor que la constante de retorno (**K₂₁**), al igual que ocurre con el fármaco inalterado florfenicol. El valor medio de la razón **K₁₂ /K₂₁** fue de $2,26 \pm 0,61$. La semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) del metabolito florfenicol amina tras la administración oral de florfenicol fue de $9,04 \pm 0,73 \text{ h}$ (TABLA 21).

TABLA 18. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol en pollos broiler tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v.

Parámetro	GRUPO 2, (nº de animales = 8)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A₁(µg/ml)	14,1	19,27	10	19,5	35	24	21,12	18
A₂ (µg/ml)	2,02	2,03	1,5	2,4	1,69	2,05	2,22	2,82
A₃ (µg/ml)	16,43	22,0	11,26	22,49	38,0	27,0	24,0	22,98
α (h⁻¹)	0,94	1,18	0,93	1,28	1,21	1,18	1,03	1,06
β (h⁻¹)	0,082	0,095	0,076	0,091	0,082	0,082	0,095	0,08
K_a (h⁻¹)	5,6	4,0	6,1	6,5	2,45	4,0	5,05	4
t_{1/2α} (h)	0,74	0,59	0,74	0,54	0,57	0,59	0,67	0,65
t_{1/2β} (h)	8,45	7,29	9,12	7,61	8,45	8,45	7,29	8,66
t_{1/2a} (h)	0,12	0,17	0,11	0,11	0,28	0,17	0,14	0,17
V_c (L/kg)	0,97	0,64	1,06	0,74	0,39	0,63	0,71	0,94
V_{d(area)} (L/kg)	5,18	4,45	5,60	4,67	5,16	5,19	4,46	5,27
K₁₂ (h⁻¹)	0,44	0,56	0,45	0,65	0,55	0,57	0,44	0,55
K₂₁ (h⁻¹)	0,21	0,23	0,20	0,25	0,17	0,197	0,2	0,25
K₁₀ (h⁻¹)	0,37	0,48	0,35	0,47	0,57	0,49	0,48	0,34
AUC (mg/h/L)	36,7	32,2	28,64	38,15	34,02	38,59	39,12	46,49
F (%)	0,78	0,68	0,61	0,81	0,72	0,82	0,83	0,98
MRT (h)	8,61	7,37	9,46	7,89	7,90	8,30	6,77	9,79
VRT (h²)	126,5	93,41	149,97	105,12	118,71	124,48	87,48	141,71
CL (L/h/kg)	0,43	0,42	0,43	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
K₁₂/K₂₁	2,14	2,41	2,24	2,64	3,14	2,91	2,17	2,23
K₁₂/K₁₀	1,18	1,16	1,31	1,38	0,96	1,17	0,90	1,597
K₂₁/K₁₀	0,55	0,48	0,58	0,52	0,31	0,40	0,41	0,72
Tmax (h)	0,41	0,48	0,38	0,34	0,63	0,47	0,42	0,53
Cmax(µg/ml)	9,89	9,65	7,37	12,48	9,82	11,63	12,96	10,21

TABLA 19. Parámetros farmacocinéticos medios de florfenicol en pollos broiler tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v.

Parámetro	GRUPO 2, (nº de animales = 8)	
	Valor medio	± SD
A ₁ (µg/ml)	20,12	7,38
A ₂ (µg/ml)	2,09	0,41
A ₃ (µg/ml)	23,02	7,79
α (h ⁻¹)	1,10	0,13
β (h ⁻¹)	0,09	0,007
K _a (h ⁻¹)	4,71	1,35
t _{1/2α} (h)	0,64	0,08
t _{1/2β} (h)	8,17	0,68
t _{1/2a} (h)	0,16	0,06
V _c (L/kg)	0,76	0,22
V _{d(area)} (L/kg)	4,99	0,42
K ₁₂ (h ⁻¹)	0,53	0,08
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,21	0,03
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,44	0,08
AUC (mg/h/L)	36,74	5,34
F (%)	78	11
MRT (h)	8,26	1,01
VRT (h ²)	118,42	22,04
CL (L/h/kg)	0,42	0,005
K ₁₂ /K ₂₁	2,49	0,37
K ₁₂ /K ₁₀	1,21	0,22
K ₂₁ /K ₁₀	0,49	0,13
Tmax (h)	0,46	0,09
Cmax(µg/ml)	10,50	1,80

TABLA 20. Parámetros farmacocinéticos del metabolito florfenicol amina en pollos broiler tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v.

<i>Parámetro</i>	GRUPO 2, (nº de animales = 8)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A₁(µg/ml)	7,98	15,96	9,8	7,39	19,4	8,75	3,12	5,69
A₂ (µg/ml)	0,75	0,62	0,72	0,55	0,53	0,64	0,89	0,45
A₃ (µg/ml)	8,96	17,48	12	9	20,3	9,94	4,23	6,98
α (h⁻¹)	0,89	1,01	0,94	0,80	1,03	0,93	0,5	0,82
β (h⁻¹)	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,06
t_{1/2α} (h)	0,78	0,68	0,74	0,87	0,67	0,74	1,39	0,84
t_{1/2β}(h)	8,88	8,35	8,66	8,77	9,49	8,77	8,77	10,66
K₁₂ (h⁻¹)	0,41	0,43	0,41	0,30	0,43	0,42	0,18	0,36
K₂₁ (h⁻¹)	0,19	0,17	0,17	0,15	0,14	0,18	0,19	0,14
K₁₀ (h⁻¹)	0,36	0,49	0,44	0,43	0,52	0,41	0,20	0,39
AUC (mg/h/L)	14,08	11,33	13,45	11,89	12,56	12,28	14,91	11,12
MRT (h)	9,31	8,60	8,96	8,21	8,65	8,95	10,29	10,24
VRT (h²)	139,26	119,13	130,20	122,49	143,87	132,84	139,37	191,54
K₁₂/K₂₁	2,17	2,53	2,39	2,05	3,03	2,35	0,93	2,61
K₁₂/K₁₀	1,13	0,89	0,93	0,71	0,83	1,01	0,89	0,93
K₂₁/K₁₀	0,52	0,35	0,39	0,35	0,27	0,43	0,97	0,36
Tmax (h)	0,83	1,00	0,89	0,89	0,89	0,86	1,28	0,77
Cmax(µg/ml)	2,80	2,35	2,91	2,74	2,91	2,59	1,92	2,47

TABLA 21. Parámetros farmacocinéticos medios del metabolito florfenicol amina en pollos broiler tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v.

<i>Parámetro</i>	GRUPO 2, (nº de animales = 8)	
	Valores medios	± SD
A₁(µg/ml)	9,76	5,37
A₂ (µg/ml)	0,64	0,14
A₃ (µg/ml)	11,11	5,35
α (h⁻¹)	0,87	0,17
β (h⁻¹)	0,08	0,007
t_{1/2α} (h)	0,84	0,23
t_{1/2β}(h)	9,04	0,73
K₁₂ (h⁻¹)	0,37	0,09
K₂₁ (h⁻¹)	0,17	0,20
K₁₀ (h⁻¹)	0,41	0,098
AUC (mg/h/L)	12,70	1,34
MRT (h)	9,15	0,76
VRT (h²)	139,84	22,56
K₁₂/K₂₁	2,26	0,61
K₁₂/K₁₀	0,92	0,12
K₂₁/K₁₀	0,46	0,22
Tmax (h)	0,93	0,16
Cmax(µg/ml)	2,59	0,34

Finalmente la TABLA 22 y la FIGURA 10 recogen los niveles medios plasmáticos de florfenicol tras la administración de una dosis única intravenosa (20 mg florfenicol/kg p.v.); y los niveles medios plasmáticos de florfenicol y su principal metabolito florfenicol amina tras la administración de una dosis única oral (20 mg florfenicol/kg p.v.) en pollos broiler.

La TABLA 23 también resume todos los parámetros farmacocinéticos calculados para el florfenicol y su principal metabolito florfenicol amina, tras la administración de una dosis única intravenosa y oral de 20 mg florfenicol/kg p.v. en pollos de engorde o broiler.

TABLA 22. Niveles plasmáticos medios de florfenicol ($\mu\text{g/ml}$) tras la administración intravenosa de dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v., y los niveles plasmáticos medios de florfenicol ($\mu\text{g/ml}$) y de su metabolito florfenicol amina ($\mu\text{g/ml}$) tras la administración oral de dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v. en pollos broiler.

TIEMPO (horas)	Vía intravenosa		Vía oral			
	Florfenicol ($\mu\text{g/ml}$)		Florfenicol ($\mu\text{g/ml}$)		Florfenicol amina($\mu\text{g/ml}$)	
	Valores medios	\pm SD	Valores medios	\pm SD	Valores medios	\pm SD
0,16	40,82	7,70	3,42	0,85	0,75	0,30
0,33	17,9	6,09	9,31	1,96	1,22	0,43
0,5	12,25	3,65	12,62	3,09	2,00	0,45
1	6,59	2,40	9,05	2,08	3,73	0,51
2	2,76	0,63	4,43	0,78	1,96	0,22
4	1,41	0,29	1,48	0,27	0,64	0,09
6	1,20	0,24	1,27	0,26	0,43	0,08
8	1,06	0,22	1,04	0,18	0,36	0,07
12	0,84	0,19	0,85	0,18	0,28	0,06
24	0,28	0,06	0,26	0,06	0,097	0,02

Figura 10.- Niveles medios plasmáticos tras dosis única intravenosa y oral de 20 mg florfenicol/kg p.v. en pollos de engorde

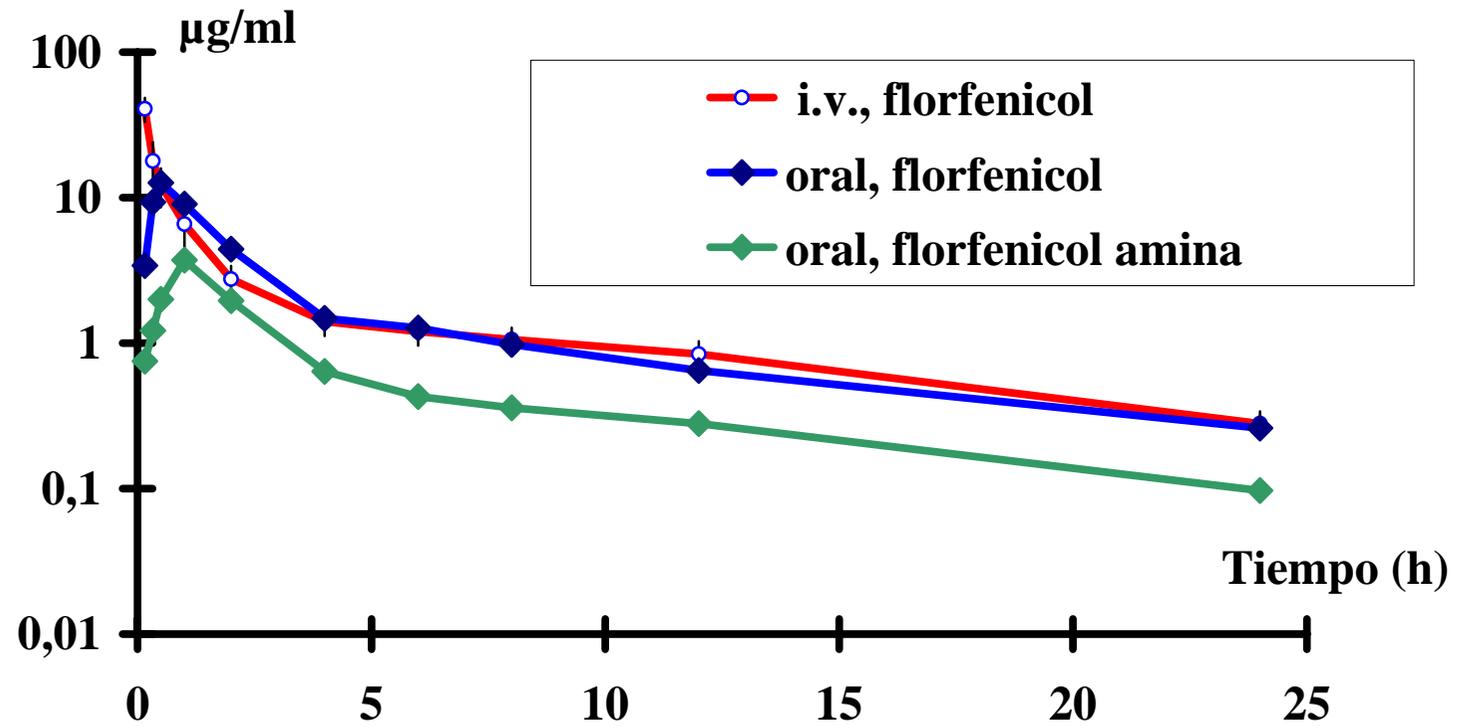


TABLA 23. Parámetros farmacocinéticos medios de florfenicol y su metabolito florfenicol amina en pollos de engorde o broiler tras administración de una dosis única intravenosa y oral de 20 mg florfenicol/kg p.v.

Parámetro	Vía intravenosa		Vía oral			
	Florfenicol		Florfenicol		Florfenicol amina	
	Valor medio ± SD		Valor medio ± SD		Valor medio ± SD	
A₁(µg/ml)	89,41	37,54	20,12	7,38	9,76	5,37
A₂ (µg/ml)	4,20	1,30	2,09	0,41	0,64	0,14
A₃ (µg/ml)	-	-	23,02	7,79	11,11	5,35
α (h⁻¹)	5,68	1,34	1,10	0,13	0,87	0,17
β (h⁻¹)	0,14	0,04	0,09	0,007	0,08	0,007
K_a (h⁻¹)	-	-	4,71	1,35	-	-
t_{1/2α} (h)	0,13	0,04	0,64	0,08	0,84	0,23
t_{1/2β}(h)	5,36	1,17	8,17	0,68	9,04	0,73
t_{1/2a}(h)	-	-	0,16	0,06	-	-
V_C(L/kg)	0,297	0,27	0,76	0,22	-	-
V_{d(area)}(L/kg)	3,39	0,99	4,99	0,42	-	-
V_{d(ss)}(L/kg)	2,34	0,98	-	-	-	-
K₁₂ (h⁻¹)	3,37	1,02	0,53	0,08	0,37	0,09
K₂₁ (h⁻¹)	0,47	0,32	0,21	0,03	0,17	0,20
K₁₀ (h⁻¹)	1,97	0,78	0,44	0,08	0,41	0,098
AUC (mg/h/L)	47,17	7,23	36,74	5,34	12,70	1,34
F (%)	-	-	78	11	-	-
MRT (h)	5,29	1,75	8,26	1,01	9,15	0,76
VRT (h²)	54,74	22,97	118,42	22,04	139,84	22,56
CL (L/h/kg)	0,46	0,09	0,42	0,005	-	-
K₁₂/K₂₁	8,86	4,19	2,49	0,37	2,26	0,61
K₁₂/K₁₀	2,33	2,41	1,21	0,22	0,92	0,12
K₂₁/K₁₀	0,45	0,78	0,49	0,13	0,46	0,22
Tmax (h)	-	-	0,46	0,09	0,93	0,16
Cmax(µg/ml)	-	-	10,50	1,80	2,59	0,34

3.3. Distribución y depleción tisular de florfenicol y su metabolito florfenicol amina tras administración oral de florfenicol

En las muestras de tejidos de los animales tratados con florfenicol a una dosis oral de 20 mg/kg p.v. durante 3 días, no se detectaron niveles de los metabolitos florfenicol ácido oxámico ni florfenicol alcohol. Únicamente se detectó el metabolito florfenicol amina.

Se detectaron niveles tisulares de florfenicol y su metabolito florfenicol amina en músculo, piel + grasa, hígado y riñón. Los niveles tisulares del florfenicol y su metabolito florfenicol amina obtenidos en pollos broiler tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg/día durante tres días consecutivos, se presentan en las TABLAS 24, 25 y 26.

Las concentraciones medias obtenidas de florfenicol y su metabolito florfenicol amina en músculo, piel + grasa, hígado y riñón se representan también mediante diagramas de barras en la FIGURA 11. En este diagrama se observa la presencia total del compuesto inalterado florfenicol y su metabolito florfenicol amina en los distintos tejidos así como su depleción.

Estos resultados demuestran que el florfenicol posee una buena distribución tisular. Veinticuatro horas después de la última dosis, los niveles medios de florfenicol encontrados en los tejidos músculo ($511,17 \pm 241,01 \mu\text{g/kg}$), riñón ($612,84 \pm 99,40 \mu\text{g/kg}$), piel + grasa ($771,83 \pm 100,24 \mu\text{g/kg}$) e hígado ($2.318,67 \pm 142,16 \mu\text{g/kg}$) y fueron superiores a los niveles encontrados en

plasma. Las máximas concentraciones de florfenicol se encontraron en orden decreciente en hígado, piel + grasa, riñón y músculo.

A los cinco días tras la administración oral de la última dosis de florfenicol, los valores medios tisulares detectados declinaron, encontrándose concentraciones de $70,50 \pm 17,85 \mu\text{g/kg}$ en músculo, $148,83 \pm 10,59 \mu\text{g/kg}$ en piel + grasa, $362,00 \pm 71,89 \mu\text{g/kg}$ en riñón y $1.058,17 \pm 126,60 \mu\text{g/kg}$ en hígado. Estos datos sugieren una más lenta eliminación de los tejidos riñón e hígado.

A los siete días tras la administración del fármaco, se detectaron los siguientes niveles de florfenicol en tejidos: $33,34 \pm 16,99 \mu\text{g/kg}$ en piel+grasa, $49,17 \pm 20,49 \mu\text{g/kg}$ en músculo, $117,34 \pm 41,81 \mu\text{g/kg}$ en riñón y $777,34 \pm 99,65 \mu\text{g/kg}$ en hígado.

Respecto a los niveles tisulares encontrados del metabolito florfenicol amina podemos observar como a las 24 horas tras la administración de florfenicol en dosis de 20 mg/kg/día durante 3 días, se detectaron niveles considerables del metabolito florfenicol amina, lo que indica una rápida biotransformación de florfenicol en el organismo. Los mayores niveles del metabolito florfenicol amina a las 24 horas tras la administración se hallaron de mayor a menor cantidad en hígado ($687,34 \pm 94,77 \mu\text{g/kg}$), riñón ($637,17 \pm 72,72 \mu\text{g/kg}$), piel + grasa ($255,50 \pm 71,57 \mu\text{g/kg}$) y músculo ($58,17 \pm 15,37 \mu\text{g/kg}$). Las concentraciones anteriormente descritas, en todos los tejidos, salvo riñón, fueron inferiores a los niveles detectados para el compuesto padre florfenicol.

A los cinco días tras la administración oral de la última dosis de florfenicol, los valores medios tisulares detectados del metabolito florfenicol amina declinaron y fueron $44,84 \pm 10,19$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ en piel + grasa, $221,00 \pm 60,12$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón, y $267,00 \pm 56,57$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hígado. No se detectaron residuos del metabolito florfenicol amina en músculo.

A los siete días tras la administración de florfenicol todavía se detectaron niveles del metabolito florfenicol amina en los siguientes tejidos: $69,50 \pm 14,07$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hígado, y $51,67 \pm 19,45$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón. No aparecieron residuos del metabolito florfenicol amina en músculo ni en piel + grasa.

TABLA 24. Niveles tisulares ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de florfenicol (FF) y su metabolito florfenicol amina (FFA) tras la administración oral de 20 mg florfenicol/kg/día durante 3 días a pollos broiler.

GRUPO 3, (nº de animales = 6)													
Tejido	Tiempo tras la última dosis (días)	1		2		3		4		5		6	
		FF	FFA										
Músculo	1	187	42	368	60	894	77	512	62	639	70	467	38
	5	47	N.D.	59	N.D.	98	N.D.	66	N.D.	82	N.D.	71	N.D.
	7	30	N.D.	44	N.D.	78	N.D.	52	N.D.	66	N.D.	25	N.D.
Piel + Grasa	1	689	287	873	293	906	318	785	302	714	192	664	141
	5	158	37	138	52	160	35	134	61	151	46	152	38
	7	36	N.D.	47	N.D.	38	N.D.	44	N.D.	35	N.D.	N.D.	N.D.
Hígado	1	2.187	732	2.460	517	2.495	717	2.205	648	2.375	721	2.190	789
	5	975	281	870	309	1.191	319	1.105	189	1.021	203	1.187	301
	7	662	79	757	89	884	77	870	58	829	60	662	54
Riñón	1	556	754	545	621	746	531	616	647	498	659	716	611
	5	463	137	300	195	374	224	429	198	313	260	293	312
	7	85	43	132	62	110	38	93	87	89	41	195	39

N.D., no detectado

TABLA 25. Niveles medios tisulares ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de florfenicol y su metabolito florfenicol amina tras la administración oral de 20 mg florfenicol/kg/día durante 3 días a pollos broiler.

GRUPO 3, (nº de animales = 6)					
Tejidos	Tiempo tras la última dosis (días)	Florfenicol		Florfenicol amina	
		Valor medio	\pm SD	Valor medio	\pm SD
Músculo	1	511,17	241,01	58,17	15,37
	5	70,50	17,85	N.D.	-
	7	49,17	20,49	N.D.	-
Piel + Grasa	1	771,83	100,24	255,50	71,57
	5	148,83	10,59	44,84	10,19
	7	33,34	16,99	N.D.	-
Hígado	1	2.318,67	142,16	687,34	94,77
	5	1.058,17	126,60	267,00	56,57
	7	777,34	99,65	69,50	14,07
Riñón	1	612,84	99,40	637,17	72,72
	5	362,00	71,89	221,00	60,12
	7	117,34	41,81	51,67	19,45

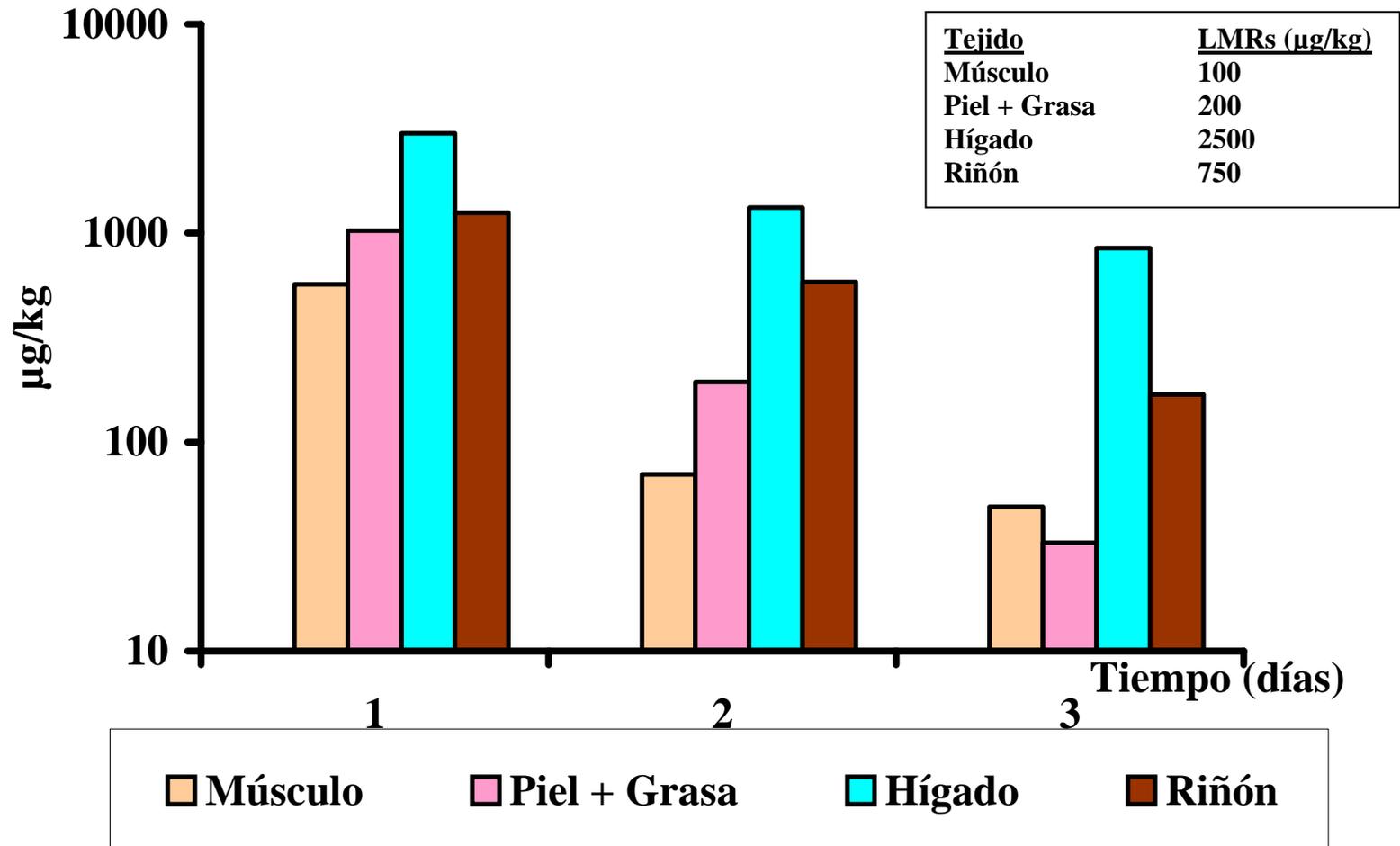
N.D., no detectado

TABLA 26. Residuos tisulares totales ($\mu\text{g}/\text{kg}$): suma de florfenicol (FF) y su metabolito florfenicol amina (FFA); residuos detectados tras la administración oral de 20 mg florfenicol/kg/día durante 3 días a pollos broiler.

Grupo 3, (nº de animales = 6)								
Tejido	Días	1	2	3	4	5	6	Valor medio \pm SD
		FF + FFA						
Músculo	1	229	428	971	574	709	505	569 \pm 253
	5	47	59	98	66	82	71	70 \pm 18
	7	30	44	78	52	66	25	49 \pm 20
Piel + Grasa	1	976	1166	1224	1087	906	805	1027 \pm 160
	5	195	190	195	195	197	190	194 \pm 3
	7	36	47	38	44	35	N.D.	33 \pm 17
Hígado	1	2919	2977	3212	2853	3096	2979	3006 \pm 129
	5	1256	1179	1510	1294	1224	1488	1325 \pm 140
	7	741	846	961	928	889	716	847 \pm 100
Riñón	1	1310	1166	1277	1263	1157	1327	1250 \pm 72
	5	600	495	598	627	573	605	583 \pm 46
	7	128	194	148	180	130	234	169 \pm 42

N.D., no detectado

**Figura 11.- Niveles medios tisulares (florfenicol + florfenicol amina)
tras dosis oral de 20 mg florfenicol/kg/día, durante
3 días, en pollos de engorde**



Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, es importante conocer la persistencia del fármaco y sus metabolitos en los tejidos de animales de consumo humano. Cuando un fármaco es administrado para propósitos terapéuticos en un animal productor de alimentos, como medida de seguridad para el consumidor se debe establecer el tiempo de espera o periodo necesario para asegurar que los residuos en los tejidos estén por debajo de los LMR establecidos.

Existen numerosos diseños experimentales y estadísticos para establecer el tiempo de espera. La Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha establecido unas recomendaciones para el uso de un programa de regresión lineal como método estadístico de elección (EMA, 1995). Usando este programa o software, el tiempo de espera se determina como el tiempo, cuando el límite de tolerancia es del 95%, para que el residuo esté por debajo del LMR, con una confianza del 95%.

Como ya mencionamos en el capítulo correspondiente a residuos, la Unión Europea (UE) ha establecido los LMR para el florfenicol de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para músculo, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para piel + grasa, 2.500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para hígado y 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para riñón, en aves, expresados como suma del compuesto padre (florfenicol) y sus metabolitos (medidos como florfenicol amina) (EUROPEAN COMMISSION, 1999, 2002).

En el presente estudio en pollos de engorde, para determinar la depleción de florfenicol y su metabolito florfenicol amina, tras la administración oral de una dosis diaria de 20 mg florfenicol/kg p.v. durante tres días, hemos evaluado los resultados de niveles tisulares totales obtenidos tomando como residuo marcador la suma del

compuesto padre (florfenicol) y sus metabolitos (medidos como florfenicol amina) (TABLA 26). Aplicando el programa estadístico recomendada por la EMEA de regresión lineal, para cada uno de los tejidos: músculo (FIGURAS 12, 13, 14, 15 y 16); piel + grasa (FIGURAS 17, 18, 19, 20 y 21), hígado (FIGURAS 22, 23, 24, 25 y 26) y riñón (FIGURAS 27, 28, 29, 30 y 31), y analizando los resultados obtenemos los siguientes tiempos de espera: 7,56 días para músculo (FIGURA 13); 8,36 días para piel + grasa (el tejido de mayor persistencia) (FIGURA 18); 3,02 días para hígado (FIGURA 23); y 5,6 días para riñón (FIGURA 28). De este modo, tomando el mayor tiempo de espera de 8,36 días, se tendría el tiempo de espera que nos define la mayor seguridad para el consumidor.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que para un régimen de dosificación de dosis oral de 20 mg florfenicol/kg p.v. durante 3 días, un tiempo de espera de 9 días podría ser el más adecuado para asegurar que los residuos en todos los tejidos, derivados del tratamiento terapéutico con florfenicol, en todos los tejidos sean inferiores a los establecidos para los LMR. El periodo de retirada de 9 días es un parámetro de seguridad alimentaria.

Experiment number:1 Number of groups: 3
 Experiment date :11-03-02 Total Number of animals: 18
 Species :pollo Factor: 1
 Tissue :musculo

group: 1

time	concentration	corrected concentration
1	229	229
1	428	428
1	971	971
1	574	574
1	709	709
1	505	505

group: 2

time	concentration	corrected concentration
5	47	47
5	59	59
5	98	98
5	66	66
5	82	82
5	71	71

group: 3

time	concentration	corrected concentration
7	30	30
7	44	44
7	78	78
7	52	52
7	66	66
7	25	25

FIGURA 12. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en músculo de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995).

Grupo 1: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 1 día (n = 6).

Grupo 2: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 5 días (n = 6).

Grupo 3: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 7 días (n = 6).

A N O V A - R E S U L T S

group 1	s2=	,241439672592538
group 2	s2=	6,54897057952873E-02
group 3	s2=	,195979882788999
SSPE=		2,51454630588412
SSREG=		428,613616501422
SSLOF=		,617286197440785
EXP (CPT)=		725,195942713126
LK=		-,420130286881962
CORR=		-,929109294430394
SXY=		,44242460539374
F-test		3,68229168814459 (1 / 15) (p>0.05)
Cochran-test		,480085954328145 (5 / 3) (p>0.05)
Bartlett-test		1,92337249915024 (2) (p> 0.05)
Shapiro/Wilk		,972222381533848 (18) (p > 0.10)

CALCULATED WITHDRAWALTIME

MRL=	100
WT=	7,559999999999988

FIGURA 13. Residuos de “florfenicol + florfenicol amina” en músculo de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Resultados de la regresión lineal. Tiempo de espera (WT) resultante para músculo.

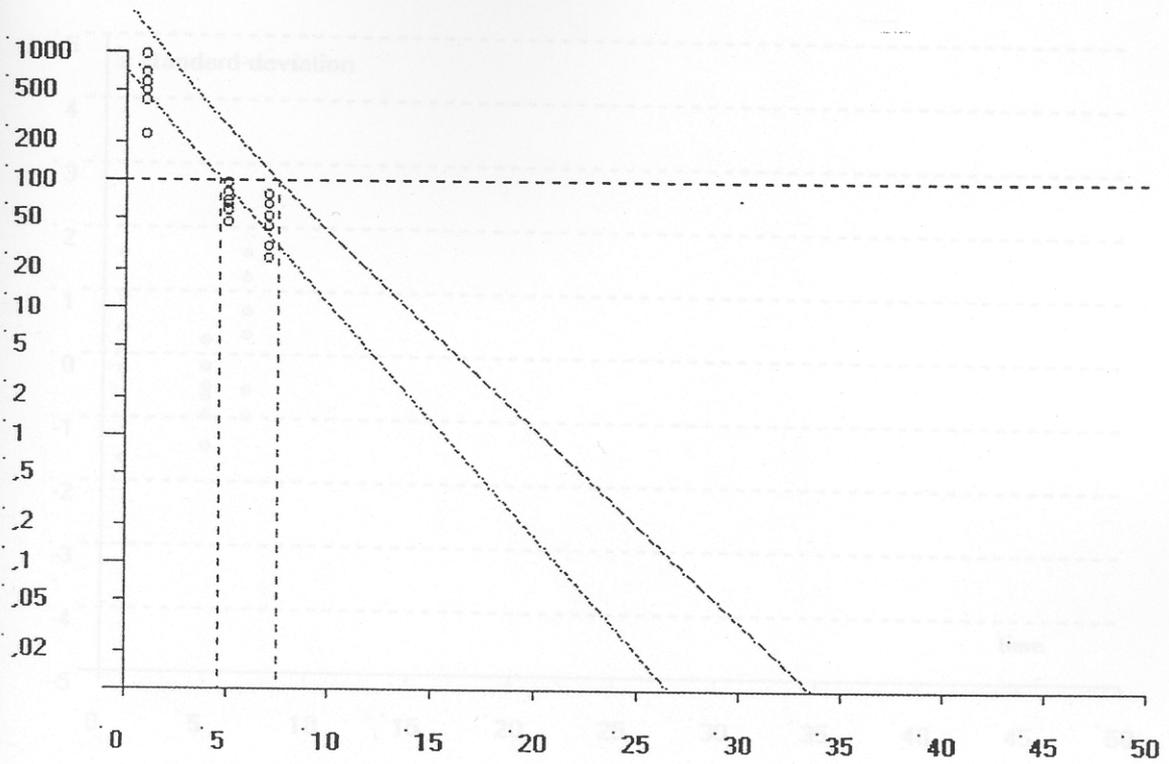


FIGURA 15. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en músculo de pollos

FIGURA 14. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en músculo de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de los resultados de la regresión lineal.

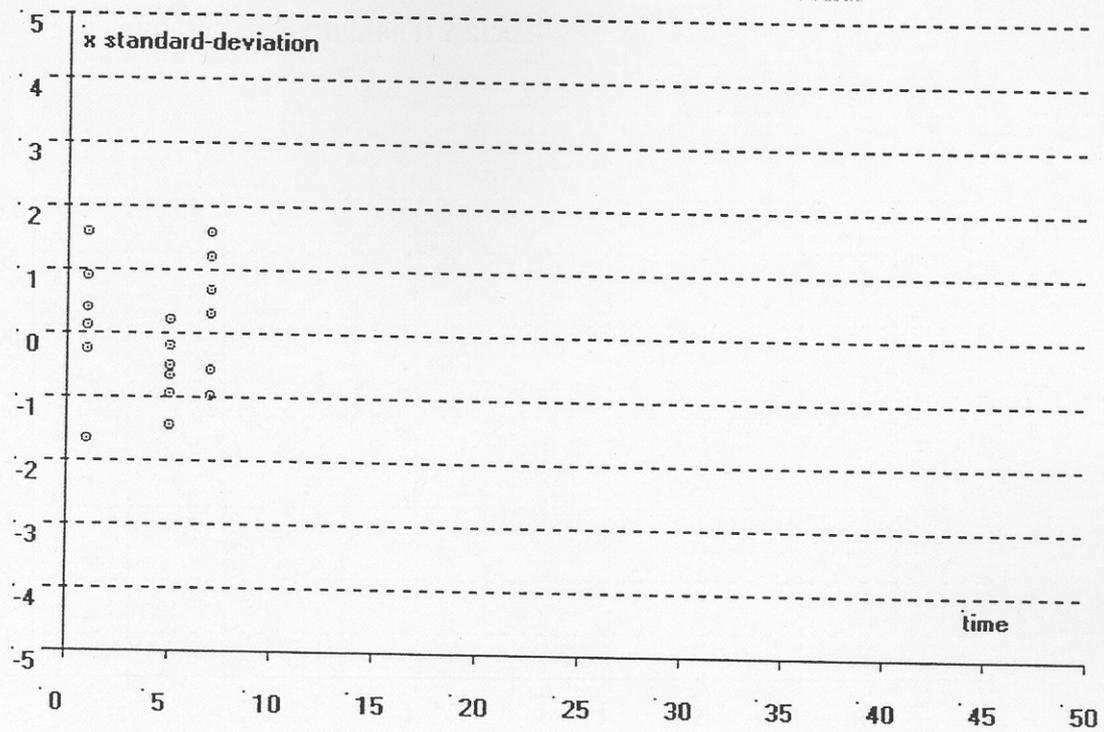


FIGURA 15. Residuos de “florfenicol + florfenicol amina” en músculo de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de la desviación estándar de los niveles de residuos en músculo.

Experiment number: 1 Number of groups: 2
 Experiment date: 1995-01-10 Total Number of animals: 18
 Species: Gallus Gallus Treatment:
 Diagram

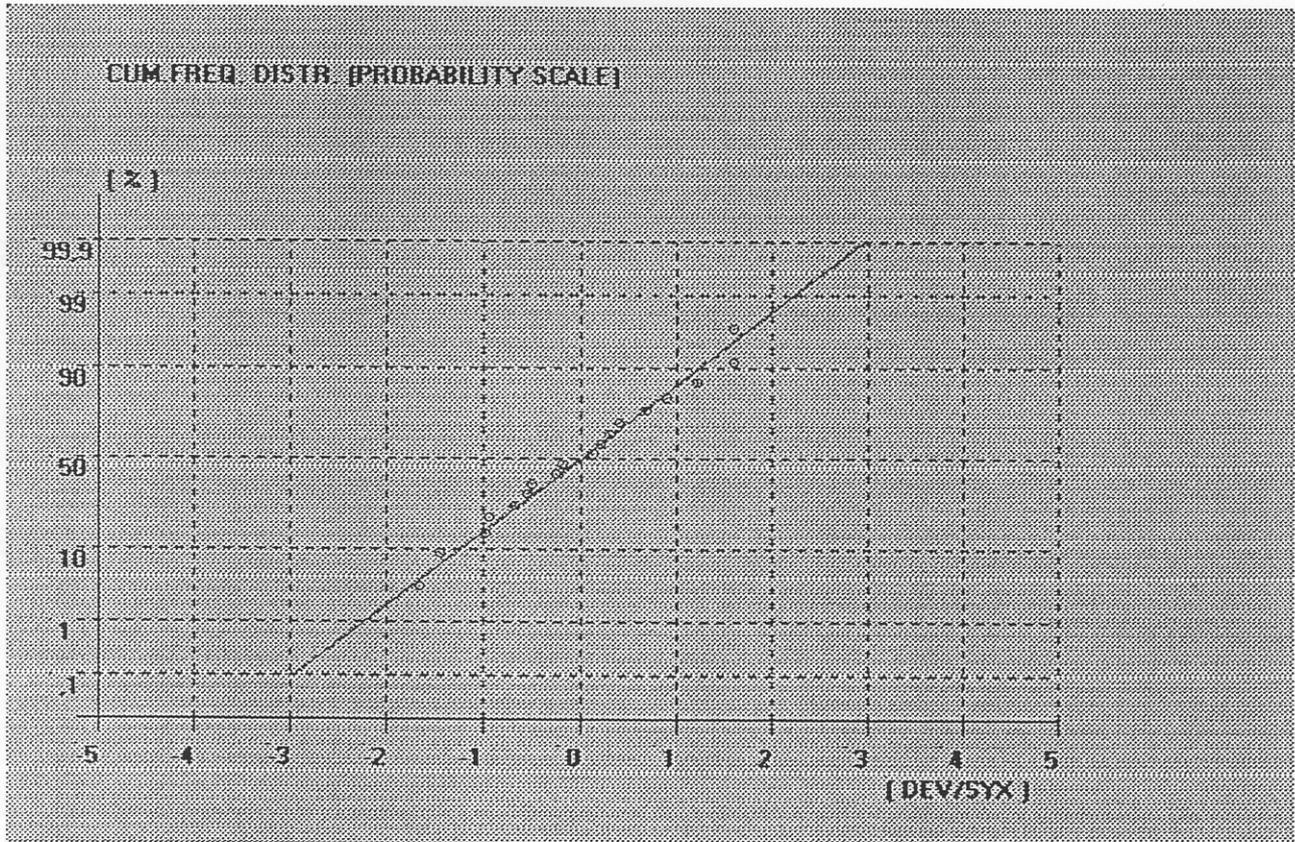


FIGURA 16. Residuos de “florfenicol + florfenicol amina” en músculo de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de la frecuencia acumulada de distribución de los niveles de residuos en músculo.

ANOVA - RESULTS

report of : floriapiel2.

Experiment number: 2 Number of groups: 3
 Experiment date : 11-03-02 Total Number of animals: 18
 Species : pollo Factor: 1
 Tissue : piel+grasa

group: 1

time	concentration	corrected concentration
1	976	976
1	1166	1166
1	1224	1224
1	1087	1087
1	906	906
1	805	805

group: 2

time	concentration	corrected concentration
5	195	195
5	190	190
5	195	195
5	195	195
5	197	197
5	190	190

group: 3

time	concentration	corrected concentration
7	36	36
7	47	47
7	38	38
7	44	44
7	35	35
7	1	1

FIGURA 17. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en piel + grasa de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995).

Grupo 1: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 1 día (n = 6).

Grupo 2: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 5 días (n = 6).

Grupo 3: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 7 días (n = 6).

A N O V A - R E S U L T S

group 1	s2=	2.54291804611951E-02
group 2	s2=	2.32622191009418E-04
group 3	s2=	2.27300029343427
SSPE=		11.4933104804324
SSREG=		507.344442702159
SSLOF=		3.21028046753787
EXP (CPT) =		2275.23259549876
LK=		-.610055132767509
CORR=		-.859787651000388
SXY=		.958631542485506
F-test		4.18975952098845 (1 / 15) (p>0.05)
Cochran-test		.988836200546442 (5 / 3) (p<0.01)
Bartlett-test		47.8377416690491 (2) (p<0.01)
Shapiro/Wilk		.59105416953814 (18) (p < 0.01)

CALCULATED WITHDRAWALTIME

MRL=	200
WT=	8.359999999999987

FIGURA 18. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en piel + grasa de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Resultados de la regresión lineal. Tiempo de espera (WT) resultante para piel + grasa.

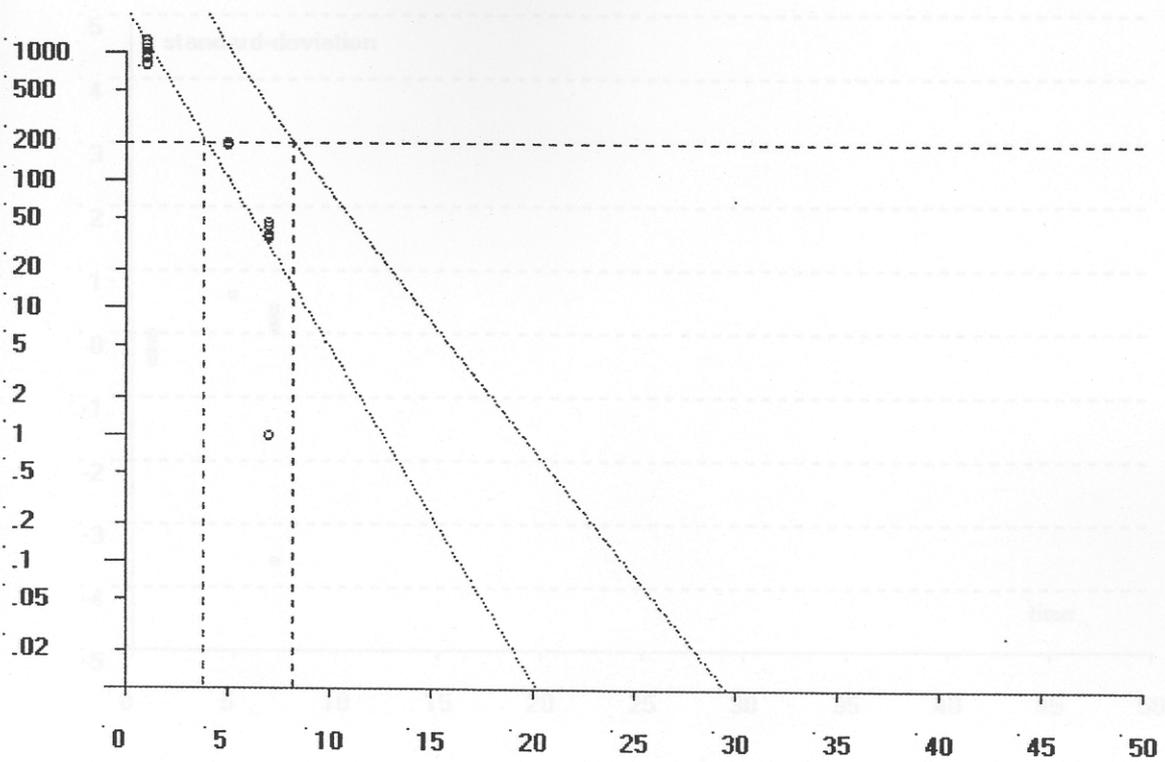


FIGURA 20. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en piel + grasa de

FIGURA 19. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en piel + grasa de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de los resultados de la regresión lineal.

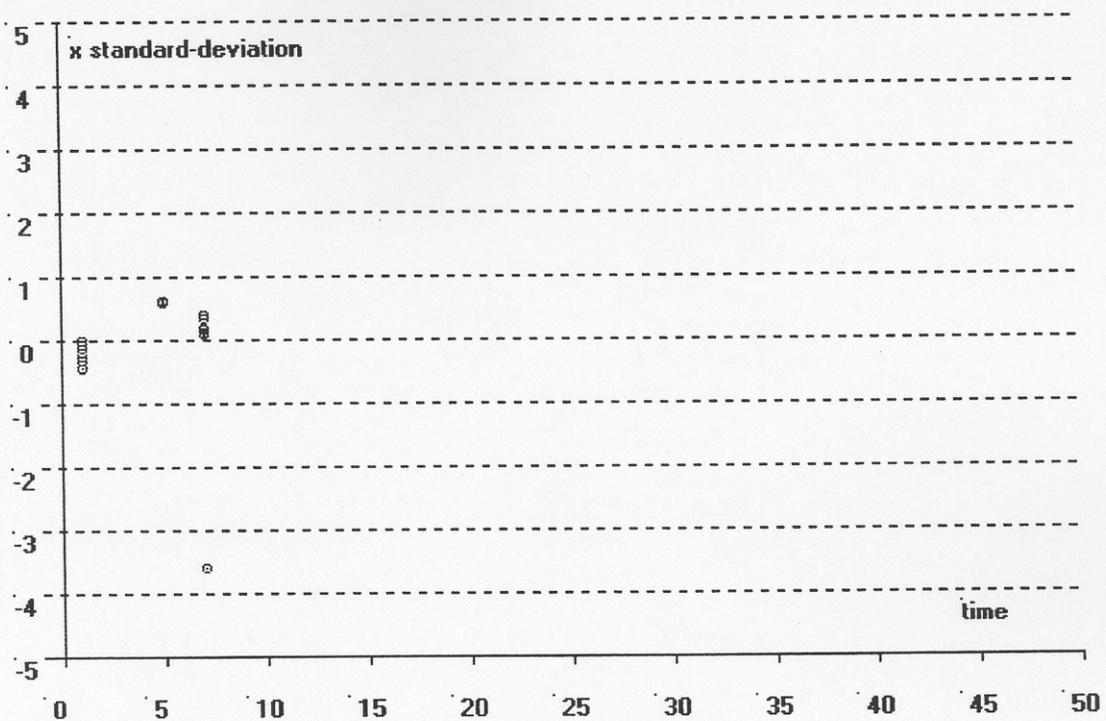


FIGURA 20. Residuos de “florfenicol + florfenicol amina” en piel + grasa de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de la desviación estándar de los niveles de residuos en piel + grasa.

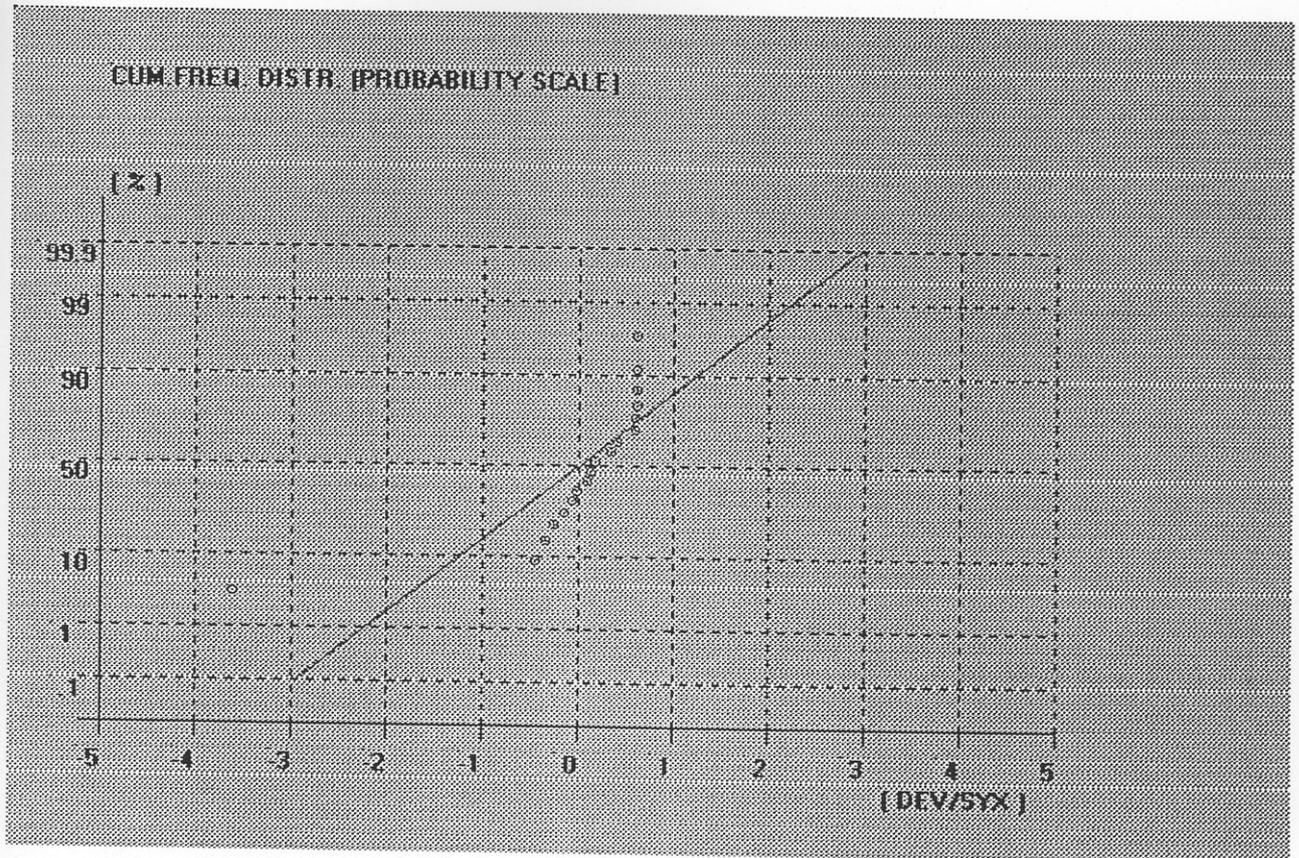


FIGURA 21. Residuos de “florfenicol + florfenicol amina” en piel + grasa de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de la frecuencia acumulada de distribución de los niveles de residuos en piel + grasa.

Grupo 4: Niveles detectados en un tiempo de retardo de 5 días (n = 6)
 Grupo 5: Niveles detectados en un tiempo de retardo de 7 días (n = 6)

ANOVA - RESULTS

Experiment number: 3 Number of groups: 3
 Experiment date : 11-03-02 Total Number of animals: 18
 Species : pollo Factor: 1
 Tissue : hígado

group: 1

time	concentration	corrected concentration
1	2919	2919
1	2977	2977
1	3212	3212
1	2853	2853
1	3096	3096
1	2979	2979

group: 2

time	concentration	corrected concentration
5	1256	1256
5	1179	1179
5	1510	1510 / 15 (p>0.05)
5	1294	1294
5	1224	1224 / 3 (p>0.05)
5	1488	1488

group: 3

time	concentration	corrected concentration
7	741	741
7	846	846
7	961	961
7	928	928
7	889	889
7	716	716

FIGURA 22. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en hígado de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995).

Grupo 1: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 1 día (n = 6).

Grupo 2: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 5 días (n = 6).

Grupo 3: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 7 días (n = 6).

A N O V A - R E S U L T S

group	1	s2=	1,80544530356634E-03
group	2	s2=	1,07525129348798E-02
group	3	s2=	1,45019387177418E-02
SSPE=			,135299484780939
SSREG=			966,658491600248
SSLOF=			2,44670392420317E-03
EXP (CPT) =			3729,8224076277
LK=			-,211110192145421
CORR=			-,986481255196679
SXY=			9,27854341697629E-02
F-test			,271254239603859 (1 / 15) (p>0.05)
Cochran-test			,535919953472903 (5 / 3) (p>0.05)
Bartlett-test			4,39940423360358 (2) (p> 0.05)
Shapiro/Wilk			,974808050029055 (18) (p > 0.10)

CALCULATED WITHDRAWALTIME

MRL=	2500
WT=	3,01999999999998

FIGURA 23. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en hígado de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Resultados de la regresión lineal. Tiempo de espera (WT) resultante para hígado.

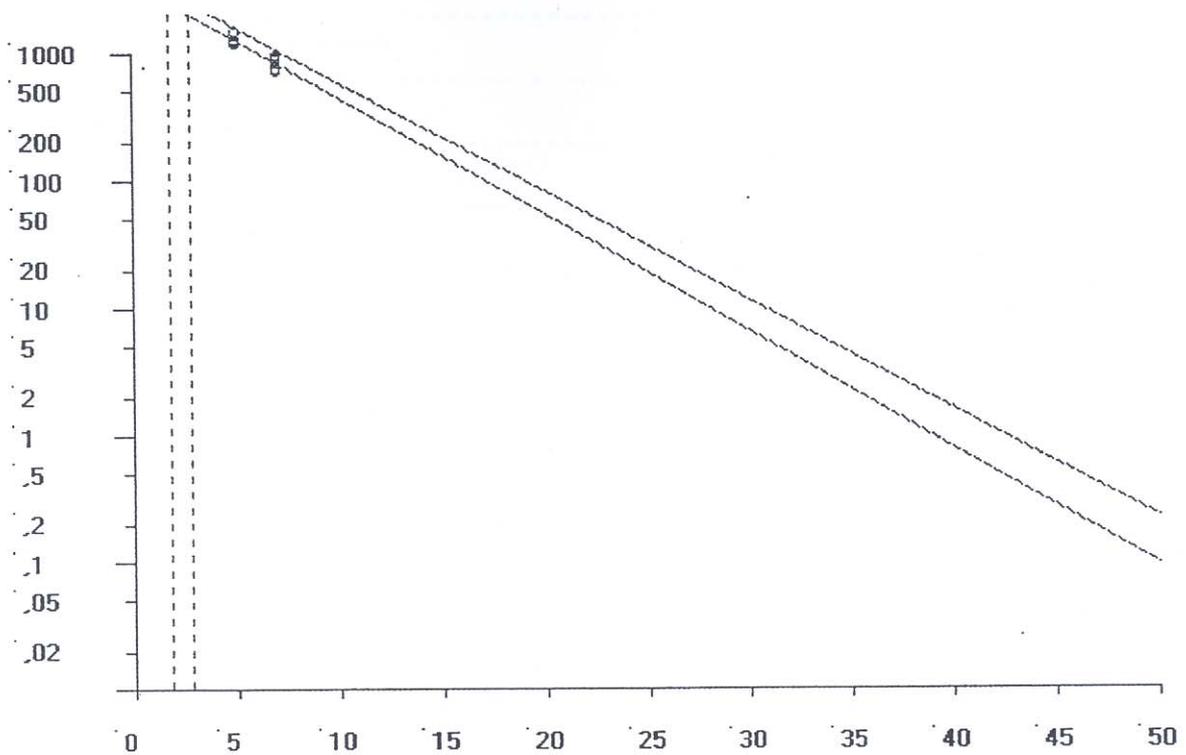


FIGURA 24. Residuos de “florfenicol + florfenicol amina” en hígado de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de los resultados de la regresión lineal.

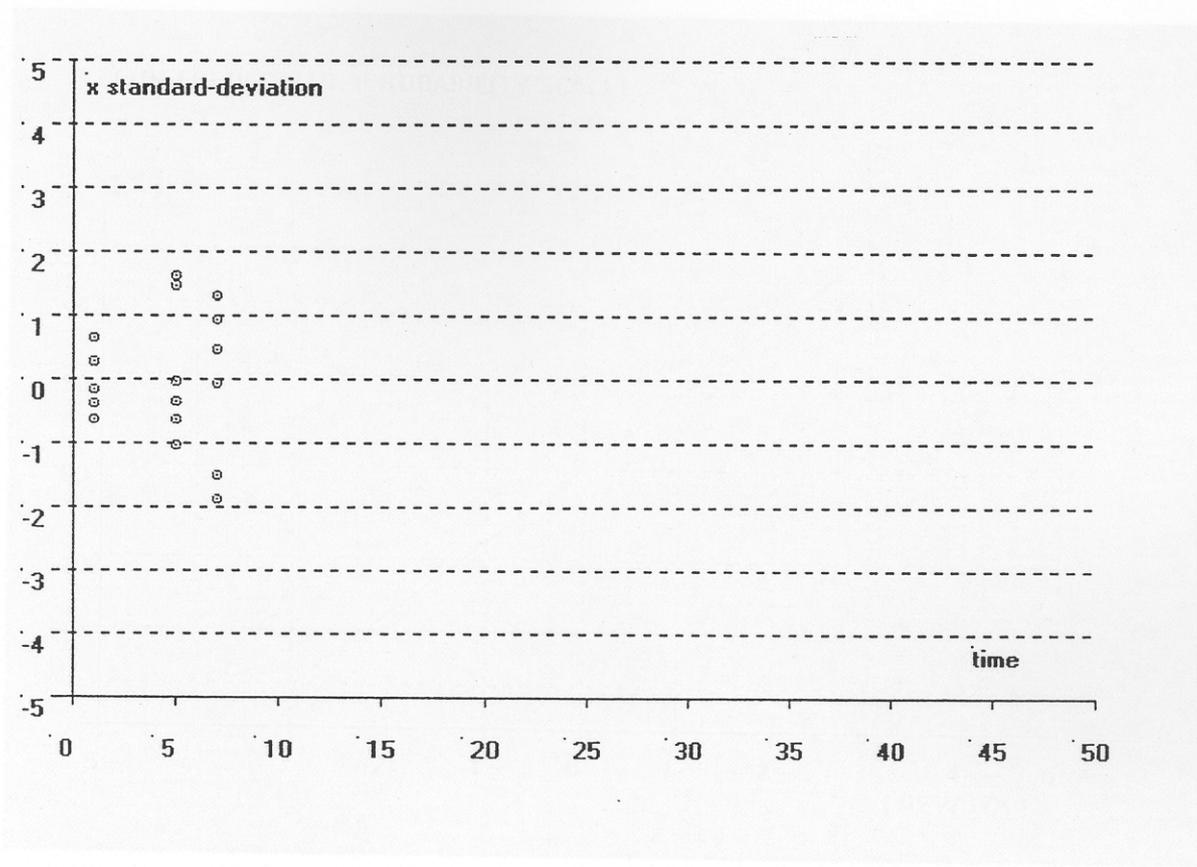


FIGURA 25. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en hígado de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de la desviación estándar de los niveles de residuos en hígado.

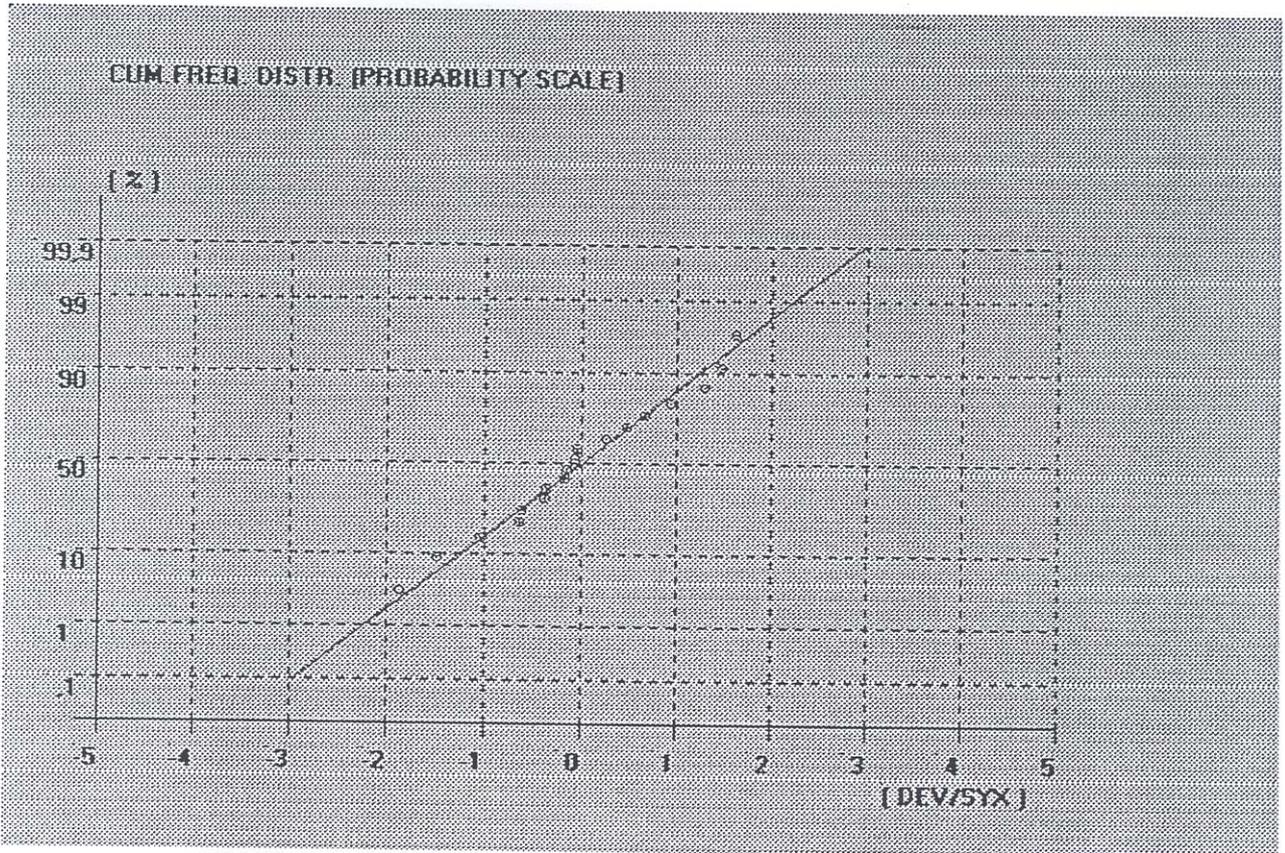


FIGURA 26. Residuos de “florfenicol + florfenicol amina” en hígado de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de la frecuencia acumulada de distribución de los niveles de residuos en hígado.

RESULTS

Experiment number:4 Number of groups: 3
 Experiment date :11-03-02 Total Number of animals: 18
 Species :pollo Factor: 1
 Tissue :riñon

group: 1

time	concentration	corrected concentration
1	1310	1310
1	1166	1166
1	1277	1277
1	1263	1263
1	1157	1157
1	1327	1327

group: 2

time	concentration	corrected concentration
5	600	600
5	495	495
5	598	598
5	627	627
5	573	573
5	605	605

group: 3

time	concentration	corrected concentration
7	128	128
7	194	194
7	148	148
7	180	180
7	130	130
7	234	234

FIGURA 27. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en riñón de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995).

Grupo 1: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 1 día (n = 6).

Grupo 2: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 5 días (n = 6).

Grupo 3: Niveles detectados en un tiempo de retirada de 7 días (n = 6).

A N O V A - R E S U L T S

group 1	s2=	3,42791920386337E-03
group 2	s2=	7,03266040698831E-03
group 3	s2=	5,77968851211866E-02
SSPE=		,341287323660192
SSREG=		703,158624089425
SSLOF=		1,32093799629983
EXP (CPT) =		1941,69352034233
LK=		-,316432567108074
CORR=		-,933226948485722
SXY=		,322318293767979
F-test		58,056858754665 (1 / 15) (p<0.025)
Cochran-test		,846748195938462 (5 / 3) (p<0.01)
Bartlett-test		9,80159764249268 (2) (p<0.01)
Shapiro/Wilk		,915167763590758 (18) (p > 0.10)

CALCULATED WITHDRAWALTIME

MRL=	750
WT=	5,599999999999993

FIGURA 28. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en riñón de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Resultados de la regresión lineal. Tiempo de espera (WT) resultante para riñón.

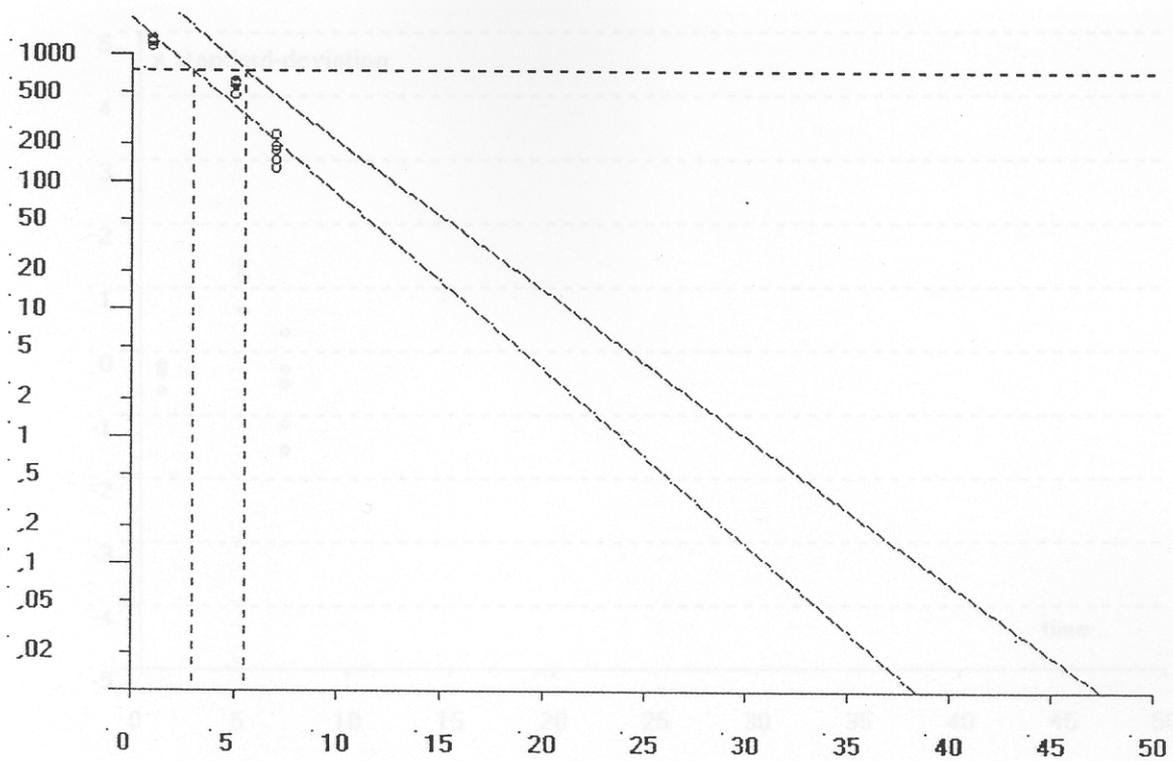


FIGURA 30. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en riñón de pollos

FIGURA 29. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en riñón de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de los resultados de la regresión lineal.

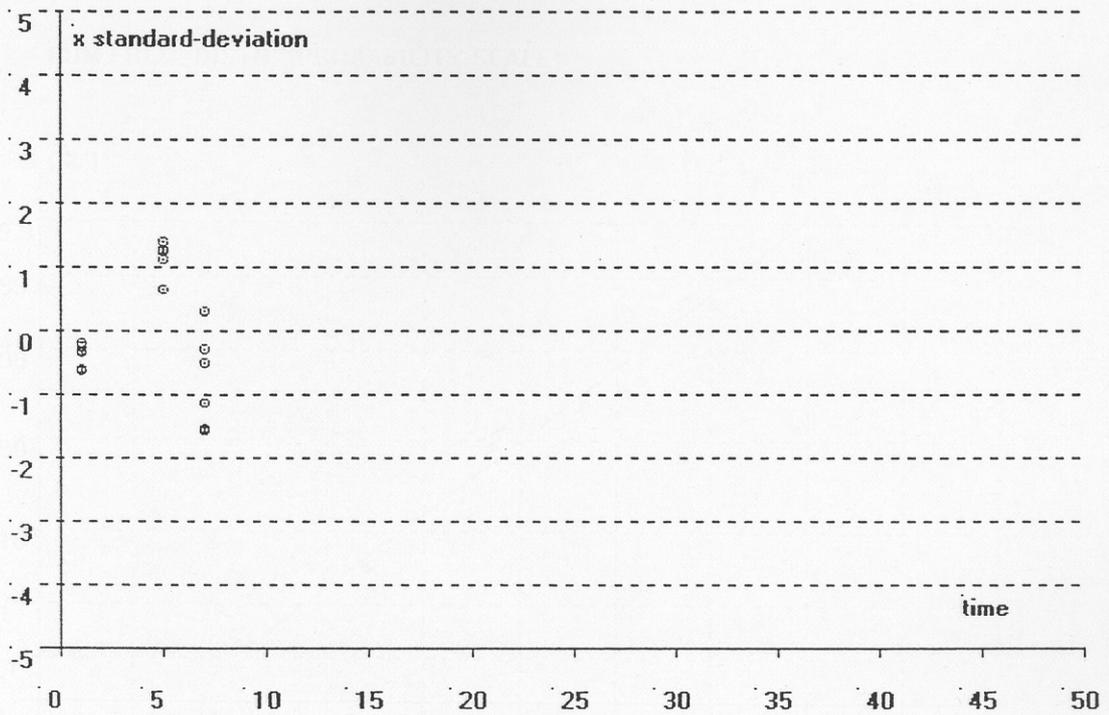


FIGURA 30. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en riñón de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, de 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de la desviación estándar de los niveles de residuos en riñón.

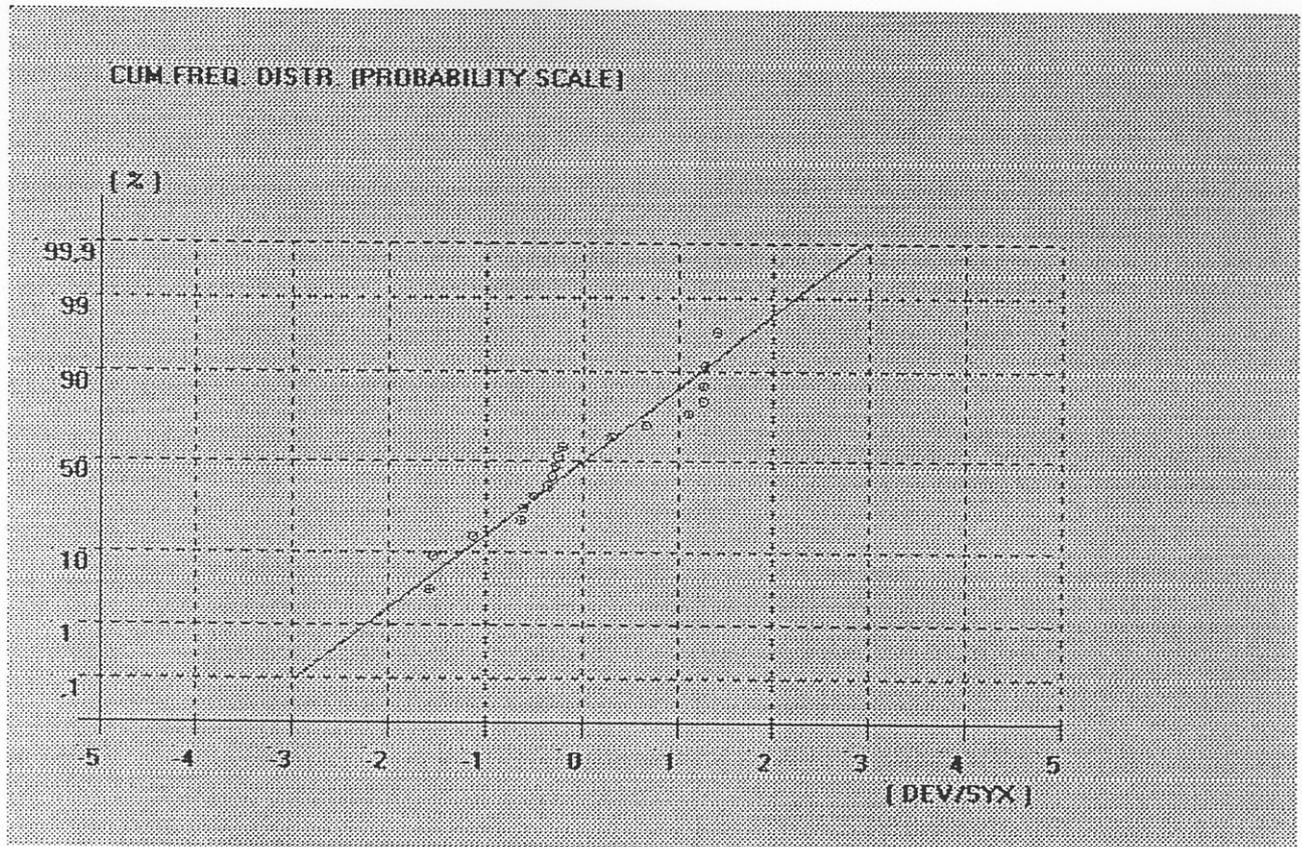


FIGURA 31. Residuos de "florfenicol + florfenicol amina" en riñón de pollos broiler tras la administración oral de florfenicol, 20 mg/kg/día, durante tres días. Datos generados usando el software de la EMEA (EMEA, 1995). Representación gráfica de la frecuencia acumulada de distribución de los niveles de residuos en riñón.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Aunque se han realizado estudios farmacocinéticos del florfenicol en diversas especies tales como bovina (VARMA *et al.*, 1986, 1991; BRETZLAFF *et al.*, 1985, 1987; ADAMS *et al.*, 1987; LOBELL *et al.*, 1994; SOBACK *et al.*, 1995), caprina (LAVY *et al.*, 1991), ovina (WETZLICH *et al.*, 2003), peces (HORMAZABAL *et al.*, 1993), equina (McKELLAR y VARMA, 1996) y porcina (UEDA *et al.*, 1995; VOORSPOELS *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2003), el perfil farmacocinético del florfenicol no ha sido completamente descrito en pollos. En la literatura existe información muy limitada sobre el comportamiento cinético del florfenicol en especies aviares, existiendo únicamente los estudios realizados por AFIFI y EL-SOUD (1997), EL-BANNA (1998), SHEN *et al.* (2003) y SWITALA *et al.* (2003), los cuales no llegan a definir completamente el perfil cinético del florfenicol.

El estudio que nosotros presentamos define el comportamiento farmacocinético del florfenicol tras su administración intravenosa y oral (20 mg/kg p.v.) en pollos de engorde o broiler. Los parámetros farmacocinéticos del florfenicol tras la administración intravenosa en pollos se describieron mediante un modelo abierto bicompartimental con una fase inicial de distribución rápida ($t_{1/2\alpha} = 0,13$ h) y una fase terminal de eliminación más lenta ($t_{1/2\beta} = 5,36$ h). Se observó un perfil farmacocinético similar también cuando se administró el florfenicol por vía oral en pollos. En las especies bovina, caprina, ovina y porcina también se ha observado la naturaleza bifásica de las curvas de concentración plasmática frente al tiempo tras la administración intravenosa de florfenicol (VARMA *et al.*,

1986; ADAMS *et al.*, 1987; LAVY *et al.*, 1991; WETZLICH *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2003). La semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) obtenida en nuestro estudio en pollos de engorde (5,36 h) fue más larga que la descrita en bóvidos, 2,8 h ó 3,8 h (VARMA *et al.*, 1986; ADAMS *et al.*, 1987) o en caprino, 2,35 h (LAVY *et al.*, 1991). Existen pocas similitudes en los parámetros farmacocinéticos del florfenicol en pollos comparados con especies de mamíferos. Las diferencias fisiológicas así como en el metabolismo del fármaco pueden haber contribuido a este resultado. La semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta} = 5,36$ h) obtenida en nuestro estudio en pollos de engorde tras administración intravenosa fue mayor que la obtenida en pollos de engorde y pavos (alrededor de 3 h) por los investigadores AFIFI y EL-SOUD (1997), SHEN *et al.* (2003) y SWITALA (2003) y que la obtenida en patos (alrededor de 7 h) por EL-BANNA (1998); diferencias en los procedimientos de extracción, así como en la técnica analítica utilizada (ensayo microbiológico) y las dosis administradas pueden ser causa de estos resultados.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en este estudio tras administración intravenosa del florfenicol confirman la idea de que, en pollos, el florfenicol se distribuye ampliamente en todos los tejidos corporales, resultado también presente en otros estudios farmacocinéticos en especies de mamíferos. En los pollos, tras administración intravenosa, el volumen aparente de distribución en la fase terminal β ($V_{d(\text{area})}$) y el volumen aparente de distribución en el estado estacionario ($V_{d(\text{ss})}$), alcanzaron valores de 3,39 y 2,34 L/kg, respectivamente, lo que sugiere la elevada distribución tisular, superior a la obtenida en bovinos (VARMA *et al.*, 1986; ADAMS *et al.*, 1987) y caprinos (LAVY *et al.*, 1991).

Con respecto al cloranfenicol, la semivida plasmática de eliminación del florfenicol en pollos encontrada en nuestro estudio de 5,36 h, fue similar a la semivida plasmática de eliminación descrita para el cloranfenicol en la misma especie animal de 5,23 h (ANADÓN *et al.*, 1994).

En nuestro estudio, el florfenicol, tras administración oral en pollos, se absorbe rápidamente, presentando una semivida plasmática de absorción ($t_{1/2a}$) de 0,16 h. La semivida de absorción ($t_{1/2a}$) fue algo más rápida a la obtenida en pollos de engorde tras administración oral de una dosis de 30 mg/kg p.v. de cloranfenicol ($t_{1/2a} = 0,23$ h) (ANADÓN *et al.*, 1994). La semivida plasmática de absorción ($t_{1/2a} = 0,16$ h) obtenida en nuestro estudio tras la administración oral de 20 mg/kg p.v. fue más rápida que la obtenida también en pollos por SHEN *et al.* (2003) ($t_{1/2a} = 0,35$ h tras dosis oral de 15 mg/kg p.v.; y $t_{1/2a} = 0,53$ h tras dosis oral de 30 mg/kg p.v.), y también más rápida que la obtenida por AFIFI y EL-SOLOUD (1997) ($t_{1/2a} = 0,36$ h tras dosis oral de 30 mg/kg p.v.).

Los parámetros farmacocinéticos tras la administración oral de florfenicol que hemos obtenido en nuestro trabajo de investigación confirman la idea de que, al igual que al ser administrado por vía intravenosa, el florfenicol tras administración oral se distribuye adecuadamente en los tejidos corporales, resultado también presente en los estudios farmacocinéticos realizados para el florfenicol en bóvidos y cápridos (VARMA *et al.*, 1986; LAVY *et al.*, 1997). En pollos, el volumen aparente de distribución ($V_{d(areá)}$) del florfenicol es de 4,99 L/kg, tras administración oral de una dosis única de 20 mg/kg p.v. de florfenicol.

Este valor indica una buena distribución tisular, superior al observado para el cloranfenicol en pollos ($V_{d(\text{area})} = 2,18 \text{ L/kg}$), tras administración oral de dosis de 30 mg/kg p.v. de cloranfenicol (ANADON *et al.*, 1994).

La biodisponibilidad de florfenicol en pollos de engorde que hemos encontrado tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v. fue de 78% (en un rango de 61 a 98%), muy superior a la observada también en pollos para el cloranfenicol (29%) (ANADÓN *et al.*, 1994). Dado que en esta investigación no se diseñó un estudio cruzado, el valor de la biodisponibilidad obtenido es una estimación de la disponibilidad sistémica, e indica que el florfenicol es ampliamente absorbido desde el tracto gastrointestinal. La biodisponibilidad del florfenicol observada en pollos de engorde en nuestro estudio es inferior a la señalada en bóvidos tras administración oral de 22 mg florfenicol/kg p.v., 88% (VARMA *et al.*, 1986); y superior a la encontrada en caprinos tras la administración intramuscular de una dosis de 25 mg florfenicol/kg p.v., 43% (LAVY *et al.*, 1991). La biodisponibilidad de florfenicol (78%, rango 61-98%) obtenida en nuestra investigación en pollos fue similar a la obtenida por SHEN *et al.* (2003) también en pollos (< 90%) tras administración oral de 15 y 30 mg/kg p.v. Otros investigadores describen en pollos de engorde y en pavos una biodisponibilidad oral del florfenicol de 55% y 59%, respectivamente (AFIFI y EL-SOUD, 1997; SWITALA *et al.*, 2003).

La concentración plasmática máxima de florfenicol alcanzada en el presente estudio ($C_{\text{max}} = 10,50 \mu\text{g/ml}$) tras la administración oral de una dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v. en pollos fue ligeramente inferior a la señalada en

bóvidos por VARMA *et al.* (1986) ($C_{max} = 11,32 \mu\text{g/ml}$); pero superior a la hallada por ADAMS *et al.* (1987) ($C_{max} = 5,7 \mu\text{g/ml}$). Esta C_{max} también fue superior a la hallada por ANADÓN *et al.* (1994) en pollos broiler tras la administración oral de una dosis de 30 mg cloranfenicol/kg p.v. ($C_{max} = 8,63 \mu\text{g/ml}$). La concentración plasmática máxima de florfenicol alcanzada en el presente estudio ($C_{max} = 10,50 \mu\text{g/ml}$) tras la administración oral de una dosis única de 20 mg florfenicol/kg p.v. en pollos de engorde fue muy superior a la observada también en pollos por los investigadores SHEN *et al.* (2003) ($C_{max} = 5,82 \mu\text{g/ml}$, tras dosis oral de 30 mg florfenicol/kg p.v.; y $C_{max} = 4,36 \mu\text{g/ml}$, tras dosis oral de 15 mg/kg p.v.) y por AFIFI y EL-SOUD (1997) ($C_{max} = 3,20 \mu\text{g/ml}$, tras dosis oral de 30 mg florfenicol/kg p.v.).

El tiempo necesario para alcanzar la concentración plasmática máxima (T_{max}) en nuestro estudio en pollos, tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v., fue rápido ($T_{max} = 0,46 \text{ h}$), muy inferior al descrito en bóvidos ($T_{max} = 2,4 \text{ h}$) tras la administración de una dosis oral única de 22 mg florfenicol/kg p.v. (VARMA *et al.*, 1986), y también muy inferior al observado en pollos de engorde por SHEN *et al.* (2003) ($T_{max} = 1,35 \text{ h}$ tras dosis oral de 30 mg florfenicol/kg p.v., y $T_{max} = 0,91 \text{ h}$, tras dosis oral de 15 mg florfenicol/kg p.v.). Respecto al cloranfenicol, el T_{max} del florfenicol encontrado en nuestro trabajo en pollos de engorde fue algo inferior al presentado ($T_{max} = 0,72 \text{ h}$) tras la administración de una dosis oral única de 30 mg cloranfenicol/kg p.v. (ANADÓN *et al.*, 1994). Estos resultados indican que el florfenicol se absorbe más rápidamente en especies aviares, que en mamíferos, quizá debido a las

particulares condiciones fisiológicas de pH en la porción inicial del tracto gastrointestinal de las aves.

En nuestro estudio, como hemos mencionado, el florfenicol, tras la administración oral de una dosis de 20 mg florfenicol/kg p.v., origina una concentración plasmática máxima (C_{max}) de 10,50 µg/ml, en un tiempo (T_{max}) de 0,46 h; además persisten concentraciones superiores a 0,85 µg/ml alrededor de 12 h tras el tratamiento, es decir, concentraciones superiores, incluso dos veces superiores a las CMI de algunos patógenos, hecho importante dado que se cuestiona si el florfenicol ejerce su acción antimicrobiana de forma concentración-dependiente o bien de forma tiempo-dependiente. Desde el punto de vista de una acción concentración-dependiente, es importante el valor encontrado de C_{max} de 10,5 µg/ml, que es más de 20 veces superior a las CMI₉₀ frente algunos de los principales microorganismos patógenos que frecuentemente causan infecciones en las aves, como *Haemophilus* spp. (0,125-0,4 µg/ml) (PRESCOTT y DESMOND, 1991; McDERMOTT *et al.*, 2001), agente causal de procesos como el Síndrome de la Cabeza Hinchada por *H. paragallinarum* o Coriza infeccioso por *H. gallinarum*. Así mismo, esta C_{max} obtenida también es muy superior a las CMI₉₀ frente a otra serie de principales microorganismos patógenos causantes de infecciones en las aves, como *S. aureus*, *E. coli* (CMI₉₀ = 3 µg/ml) (NEW y KWUNG, 1980; ZIV *et al.*, 1987), microorganismos causantes de procesos como estafilococias, colibacilosis y onfalitis; *Salmonella* spp. y *Klebsiella* spp. (CMI₉₀ = 3 µg/ml) (NEW y KWUNG, 1980), microorganismos causantes de procesos como pullorosis, tifosis o paratifosis; y *P. multocida* (CMI₉₀ ≤ 0,12 -2

$\mu\text{g/ml}$) (PRIEBE y SCHWARZ, 2003; SHIN *et al.*, 2004), microorganismo causante de pasteurelosis o cólera aviar. Por otro lado, la concentración máxima plasmática obtenida en el presente trabajo ($C_{\text{max}} = 10,5 \mu\text{g/ml}$) es también superior, aunque en menor grado, a las CMI_{90} para *Bordetella bronchiseptica* ($\text{CMI}_{90} = 2-4 \mu\text{g/ml}$) y para *Streptococcus* spp. ($\text{CMI}_{90} = 6,2 \mu\text{g/ml}$), microorganismos con CMI más altas que para otros patógenos (PRESCOTT y DESMOND, 1991; PRIEBE y SCHWARZ, 2003; SHIN *et al.*, 2004).

Sin embargo hay que tener en cuenta que hasta el momento no se han descrito en la literatura ensayos microbiológicos de sensibilidad al florfenicol realizados con cepas de microorganismos patógenos aislados específicamente de aves con procesos infecciosos. No obstante, al llevar a cabo el análisis de la relación de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (relación PK/PD) para el florfenicol a partir de los datos cinéticos obtenidos en nuestro trabajo de investigación y los datos de sensibilidad *in vitro* del florfenicol frente a los principales microorganismos patógenos que afectan a aves, a otras especies animales con CMI_{90} ya descritas (porcina, bovina y peces) y a la especie humana, se estima que el florfenicol puede ser eficaz en el tratamiento de infecciones en aves causadas por los microorganismos previamente mencionados.

También es del todo importante analizar el área bajo la curva de niveles plasmáticos-tiempo (AUC) obtenida en nuestro estudio, tras dosis oral de 20 mg florfenicol/kg p.v., con un valor medio de 37 mg/h/L, evaluando la relación

AUC/CMI₉₀ como parámetro (PK/PD) que predice una dosis eficaz y que minimiza la aparición de resistencias (HYATT *et al.*, 1995). En el presente trabajo, la relación AUC/CMI₉₀ alcanza valores mayores de 92 frente a *Haemophilus spp.* y *Pasteurella multocida*, y valores mayores de 12 para patógenos tales como *Salmonella*, *Klebsiella* y *E. Coli*.

Por otra parte, para antibióticos que actúan tiempo-dependiente, los criterios para predecir una dosis óptima requieren C_{max} mayor de dos veces la CMI, y la concentración plasmática debe exceder a la CMI durante al menos la mitad del intervalo de la dosis (CRAIG, 1998; LEES y ALIABADI, 2002). En el presente estudio, una concentración media plasmática de florfenicol de 1,48 ± 0,27 µg/ml se mantiene durante al menos 4 horas en los ocho pollos estudiados tras la dosis única oral de 20 mg florfenicol/kg p.v.; esta concentración declina a 1,27 ± 0,26 µg/ml a las 6 horas, a 1,04 ± 0,18 µg/ml a las 8 horas y a 0,85 ± 0,18 µg/ml a las 12 horas.

La familia de los fenicoles, como el florfenicol, tienen un intenso efecto bacteriostático *in vitro* sobre las especies patógenas que afectan al tracto gastrointestinal y respiratorio: *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*; *Enterococci*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* (NEW y KWUNG, 1980); *P. haemolytica* y *P. multocida* (UEDA y SUENAGA, 1995); *A. pleuropneumoniae* (ZIV *et al.*, 1987); *P. piscicida* (KIM y AOKI, 1993) y, virtualmente, todas las bacterias patógenas del tracto urinario (por el elevado porcentaje de eliminación del compuesto padre inalterado por esta vía). Si consideramos, además, la concentración máxima plasmática (C_{max}) obtenida

y los datos de CMI señalados para algunas bacterias patógenas en medicina veterinaria (NEW y KWUNG, 1980; ZIV *et al.*, 1987), el florfenicol podría ser eficaz frente a los ya mencionados microorganismos patógenos más frecuentemente implicados en infecciones aviares. En nuestro estudio, y basándonos en los resultados obtenidos de las relaciones PK/PD para antibióticos concentración-dependiente (C_{max}/CMI_{90} , AUC/CMI_{90}) y para antibióticos tiempo-dependiente ($C_{max} > 2 CMI_{90}$, $T > CMI_{90}$, siendo el tiempo en que la concentración plasmática se mantiene por encima de la CMI_{90}), se puede indicar que dosis orales de 20 florfenicol/kg p.v. a intervalos de 24 horas (durante tres días consecutivos) podría ser un régimen de dosificación adecuado para el control de infecciones en pollos de engorde.

Es importante, desde el punto de vista de la salud pública, conocer la persistencia del fármaco y sus metabolitos en los tejidos de animales de consumo humano, cuando el florfenicol se administra para propósitos terapéuticos. Para ello, se ha establecido el tiempo de espera o periodo de retirada del medicamento previo al sacrificio del animal, periodo necesario para asegurar que los residuos estén por debajo de los LMR establecidos. Existen numerosos diseños experimentales y estadísticos para establecer el tiempo de espera, así, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha establecido unas recomendaciones para el uso de la técnica de regresión lineal como método de elección (EMA, 1995). Usando este método, el tiempo de espera se determina como el tiempo, cuando el límite de tolerancia es del 95%, para que el residuo esté por debajo del LMR, con una confianza del 95%.

La Unión Europea (EUROPEAN COMMISSION, 1999, 2002) ha establecido los LMR para el florfenicol en aves de 100 µg/kg para músculo, 200 µg/kg para piel + grasa, 2.500 µg/kg para hígado y 750 µg/kg para riñón, expresados como suma del compuesto padre (florfenicol) y sus metabolitos medidos como florfenicol amina, metabolito final en las vías de biotransformación del florfenicol (FIGURA 4).

En nuestro estudio, teniendo en cuenta los ensayos realizados para aves, y tomando como residuo marcador la suma del compuesto padre (florfenicol) y sus metabolitos (medidos como florfenicol amina), y utilizando la técnica recomendada mencionada *ut supra* (EMEA, 1995) de regresión lineal, obtenemos un tiempo de espera de: 7,56 días para músculo; 8,36 días para piel + grasa (el tejido de mayor persistencia); 3,02 días para hígado; y 5,6 días para riñón, tras el régimen de dosificación de 20 mg/kg/día vía oral, durante tres días consecutivos.

En conclusión, hemos observado que el florfenicol posee propiedades farmacocinéticas óptimas para el uso terapéutico frente a infecciones comunes en aves. Para una dosis oral de 20 mg/kg p.v. de florfenicol, durante 3 días, en pollos de engorde o broiler, un tiempo de espera de 9 días podría ser adecuado para predecir que las concentraciones de residuos en los tejidos sean menores que el LMR establecido por la UE, como parámetro de seguridad alimentaria.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1) Se ha estudiado en un conjunto de dieciséis pollos de engorde o broiler (machos Ross) el comportamiento farmacocinético del compuesto antimicrobiano florfenicol y de su principal metabolito florfenicol amina. Por el momento, no se han descrito en la literatura datos farmacocinéticos completos de estos compuestos en pollos de engorde o broiler. Nuestro estudio proporciona información sobre el comportamiento farmacocinético del florfenicol y su principal metabolito florfenicol amina en pollos de engorde o broiler.

2) El estudio farmacocinético recoge dos investigaciones:

a) Se han evaluado las concentraciones plasmáticas y los parámetros farmacocinéticos correspondientes del florfenicol tras una dosis única intravenosa de 20 mg/kg p.v. y tras una dosis única oral de florfenicol de 20 mg/kg p.v.

b) Se han evaluado también las concentraciones plasmáticas y los parámetros farmacocinéticos correspondientes de su principal metabolito florfenicol amina tras una dosis única oral de 20 mg/kg p.v.

3) Las concentraciones plasmáticas-tiempo del florfenicol encontradas experimentalmente en pollos tras administración de una dosis, intravenosa y oral, 20 mg/kg p.v., se ajustan adecuadamente a un modelo abierto

bicompartimental para su análisis cinético, obteniéndose respectivamente las siguientes ecuaciones exponenciales:

$$C = 89,41.e^{-5,68t} + 4,20.e^{-0,14t}$$

$$C = 20,12.e^{-1,10t} + 2,09.e^{-0,09t} - 23,02.e^{-4,71t}$$

4) Los parámetros farmacocinéticos plasmáticos que describen las fases de absorción, distribución y eliminación del florfenicol en pollos de engorde o broiler fueron distintos de los parámetros farmacocinéticos señalados en la literatura para bóvidos, équidos y cápridos.

5) En pollos, el florfenicol tras administración intravenosa muestra una rápida fase de distribución (α), seguida de una fase de eliminación (β) más lenta. La semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) y el tiempo medio de residencia (MRT) en plasma fueron 5,36 h y 5,29 h, respectivamente.

6) En pollos, el florfenicol se absorbe amplia y rápidamente tras su administración oral con una semivida plasmática de absorción ($t_{1/2a}$) de 0,16 h, una concentración máxima plasmática (C_{max}) de 10,50 $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de 0,46 h; se distribuye ampliamente por los tejidos corporales con un volumen aparente de distribución en la fase β de eliminación ($V_{d(\text{area})}$) de 4,99 L/kg y un volumen de distribución en el estado estacionario ($V_{d(ss)}$) de 3,49 L/kg; y se elimina lentamente del organismo, con una semivida plasmática de

eliminación ($t_{1/2\beta}$) y un aclaramiento plasmático total (CL) de 8,17 h y 0,42 L/h/kg, respectivamente.

7) La fracción de dosis absorbida tras administración oral o biodisponibilidad del florfenicol es de 78 %.

8) Nuestros resultados demuestran que el florfenicol en pollos sufre un amplio metabolismo. El principal metabolito fue florfenicol amina, que aparece rápidamente en plasma tras la administración oral de florfenicol, obteniéndose una concentración máxima plasmática (C_{max}) de este metabolito de 2,59 $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de 0,93 h.

9) El metabolito florfenicol amina se elimina más lentamente del plasma que el compuesto padre florfenicol tras la administración oral de 20 mg florfenicol/kg p.v., con una semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de 9,04 h para este metabolito frente a 8,17 h para el florfenicol.

10) Se han estudiado también en un total de dieciocho pollos la distribución y depleción tisular del compuesto antimicrobiano florfenicol y de su principal metabolito detectado en plasma, el metabolito florfenicol amina. Se han evaluado las concentraciones de florfenicol y de su principal metabolito florfenicol amina en los tejidos músculo, piel + grasa, hígado y riñón, tras administración oral de 20 mg florfenicol/kg/día, durante tres días consecutivos. Tras la última dosis de este régimen de dosificación se evalúan las concentraciones tisulares de florfenicol y de su principal metabolito florfenicol

amina a los intervalos de tiempo de 1, 5 y 7 días.

11) El florfenicol se distribuye ampliamente en los tejidos encontrándose altas concentraciones, en un rango de 511,17 - 2.318,67 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los tejidos (en orden creciente) músculo, riñón, piel + grasa e hígado, 1 día después de la última dosis. Estos niveles son superiores a los LMRs fijados para el florfenicol en aves.

12) Tras un periodo de retirada del tratamiento de cinco días, las concentraciones tisulares de florfenicol declinaron significativamente alcanzando valores medios de 70,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo, 148,83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en piel + grasa, 362,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón y 1.058,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hígado. Estos niveles son inferiores a los LMRs fijados para el florfenicol en aves.

13) Tras un periodo de retirada del tratamiento de siete días, las concentraciones tisulares encontradas fueron muy pequeñas, con valores de 33,34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en piel + grasa, 49,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo, 117,34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón y 777,34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hígado.

14) El metabolito florfenicol amina se detectó en el riñón a concentraciones equivalentes al compuesto inalterado florfenicol en el día 1 tras la última dosis de la administración de florfenicol (637,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ versus 612,84 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

15) Las concentraciones tisulares del metabolito florfenicol amina alcanzaron valores medios de 58,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo, 255,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en piel + grasa,

637,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón y 687,34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hígado, 1 día después de la última dosis de florfenicol. Estas concentraciones tisulares declinaron lentamente alcanzando valores medios de 44,84 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en piel + grasa, 221,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón y 267,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hígado, a los 5 días tras la última dosis de florfenicol. No se detectaron concentraciones de florfenicol amina en músculo.

16) A los 7 días tras la administración de la última dosis de florfenicol, las concentraciones de florfenicol amina encontradas fueron muy pequeñas con valores de 51,67 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 69,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón e hígado, respectivamente. En los tejidos músculo y piel + grasa no se detectaron concentraciones de florfenicol amina (análisis por cromatografía líquida, límite de determinación 0,04 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

17) Tras aplicar el análisis estadístico de regresión lineal para calcular el tiempo de espera, aconsejado por la Agencia Europea del Medicamento, en nuestro estudio, obtenemos un tiempo de espera o de retirada de: 7,56 días para músculo; 8,36 días para piel + grasa; 3,02 días para hígado; y 5,6 días para riñón.

18) En función de los resultados de nuestro estudio farmacocinético, teniendo en cuenta la relación PK/PD, y de los resultados de residuos, se sugiere que en pollos de engorde o broiler, un régimen de dosificación de 20 mg florfenicol/kg/día, vía oral, durante tres días, podría ser de valor terapéutico para infecciones comunes (aunque se requieren ensayos clínicos complementarios para confirmar dicho régimen terapéutico); y que para

protección del consumidor, como parámetro de seguridad alimentaria, un tiempo de espera o periodo de retirada de 9 días aseguraría que las concentraciones de residuos (niveles de florfenicol + florfenicol amina) en todos los tejidos (músculo, piel + grasa, hígado y riñón) fueran menores a los LMRs establecidos por la Unión Europea para esta especie aviar.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

ABD EL-AZIZ, M.I., EL-BANNA, H.A. and EISSA, S.I. (1996). Efficacy and residual pattern of some fluoroquinolones in poultry. *Journal of Egyptian Veterinary Medical Association* **56**, 425-428.

ABDENNEBI, E.H., ASHRAF, M. and STOWE, C.M. (1983). Pharmacologic studies with thiamphenicol in horses and cattle. *Proceedings of the 66th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease*, Chicago (USA) *Abstract* **82** (16).

ABDENNEBI, E.H., SAWCHUK, R.J. and STOWE, C.M. (1994). Thiamphenicol pharmacokinetics in beef and dairy cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **17**(5), 365-368.

ABDENNEBI, E.H., KHALES, N., SAWCHUK, R.J. and STOWE, C.M. (1994). Thiamphenicol pharmacokinetics in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **17**(1), 12-16.

ABDENNEBI, E.H., SAWCHUK, R.J. and STOWE, C.M. (1994). Pharmacokinetics and distribution of thiamphenicol in sheep given repeated intramuscular doses. *Veterinary Research* **25**(5), 489-494.

ADAMS, P.E., VARMA, K.J., POWERS, T.E. and LAMENDOLA, J.F. (1987). Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in male veal calves given repeated doses. *American Journal of Veterinary Research* **48**(12), 1725-1732.

AFIFI, N.A. and EL-SOUD, K.A. (1997). Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *British Poultry Science* **38**, 425-428.

ALLEN, E.H. (1985). Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues from food-producing animals. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **68**(5), 991-999.

ALMAJANO, J., CALVO, J.E., MADELENAT, A. and RIOS, A. (1998). Eficacia de florfenicol comparado con una formulación de peni-estrepto/dexametasona en el tratamiento del síndrome respiratorio bovino. *Medicina Veterinaria* **15**, 30-37.

ANADÓN, A. (1985). Standard residue regulations for chloramphenicol in Spain. *Annales de Recherches Vétérinaires* **16**(2), 149-153.

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.

- ANADÓN, A. and REEVE-JOHNSON, L. (1999). Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Research in Veterinary Science* **66**, 197-203.
- 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.
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. y MARTÍNEZ, M.A. (1999). Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal (I). *Industria Farmacéutica*, Enero/Febrero.
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. y MARTÍNEZ, M.A. (1999). Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal (II). *Industria Farmacéutica*, Marzo/Abril.
- ANDERSON, E.S. and SMITH, H.R. (1972). Chloramphenicol resistance in the typhoid bacillus. *British Medical Journal* **3**, 329-331.
- ANDERSON, K.L., NEFF-DAVIS, C.A. and DAVIS, L.E. (1983). Pharmacokinetics of chloramphenicol in non-lactating cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **6**, 305-313.
- ANDERSON, K.L. (1984). Inflammation, phagocytosis and effect of flunixin meglumine during endotoxin-induced mastitis. *PhD thesis, University of Illinois. Urbana.*
- ATEF, M., ATTA, A.H. and AZIZA, M. (1991). Pharmacokinetics of chloramphenicol in normal and *Escherichia coli* infected chickens. *British Poultry Science* **32**, 589-596.
- AZZOLINI, F., GAZZANIGA, A. and LODOLA, E. (1970). Thiamphenicol excretion on subjects with renal insufficiency. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapeutics and Toxicology* **4**, 303-308.
- AZZOLLINI, F., GAZZANIGA, A., LODOLA, E. and NATANGELO, R. (1972). Elimination of chloramphenicol and thiamphenicol in subjects with cirrhosis of the liver. *International Journal of Clinical Pharmacology Research* **6**, 130-134.
- BACHMAN, H.J., BICKFORD, S.M. and KOHN, F.S. (1975). Comparative *in vitro* activity of gentamicin and other antibiotics against bacteria isolated from clinical samples of dogs, cats, horses and cattle. *Veterinary Medicine Small Animal Clinics*, October, 1218-1222.
- BAGGOT, J.D. and GINGERICH, D.A. (1976). Pharmacokinetic interpretation of erythromycin and tylosin activity in serum after intravenous administration of single dose to cows. *Research in Veterinary Science* **21**, 318-323.

- BAGGOT, J.D. (1980). Distribution of antimicrobial agents in normal and diseased animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **176**, 1085-1090.
- BAGGOT, J.D. (1995). Antimicrobial therapy in the horse. *Eds: A. Higgins and I.M. Wright. Saunders Co., Philadelphia.* pp. 189-203.
- BAINE, W.B., FARMER, J.J., GANGAROSA, E.J., HERMANN, G.T., THORNSBERRY, C. and RICE, P.A. (1977). Typhoid fever in the United States associated with the 1972-1973 epidemic in Mexico. *Journal of Infectious Diseases* **37**, 649-653.
- BARTON, S.J. and WILSON, J.A. (1989). Sch 25298: Dose range finding reproductive assay in male rats. *Research report n° A-23623*, pp. 59.
- BARTON, S.J. and WILSON, J.A. (1989). Sch 25298: Dose range finding reproductive assay in female rats. *Research report n° A-23622*, pp. 61.
- BARTON, S.J. (1991). Sch 25298: Two generations reproduction study in rats. *Research report n° A-24920*, pp. 237.
- BARTZ, Q.R. (1948). Isolation and characterization of chloromycetin. *Journal of Biological Chemistry* **172**, 445-450.
- BERRY, D.J. (1987). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in small biological samples. *Journal of Chromatography* **385**, 337-341.
- BORDES, F., MADELENAT, A., DALLE, S., DE HAAS, V., LOOCKWOOD, P.W. and VARMA, K.W. (1995). Evaluation of the efficacy of florfenicol (Nuflor) and comparison with amoxicillin (Clamoxyl LA) in the treatment of bovine respiratory disease. *Revue de Médecine Vétérinaire* **146**(11), 731-736.
- BORIES, G.F. (1994). Metabolism of chloramphenicol: a Story of nearly 50 Years. *Drug Metabolism Reviews* **26**(4), 767-783.
- BREE, M.M., PARK, J.S. and SHORT, C.E. (1975). *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* **70**, 1309.
- BREST, W.R. (1967). Chloramphenicol-associated blood dyscrasias. *Journal of the American Medical Association* **201**, 181-188.
- BRETZLAFF, K.N., NEFF-DAVIS, C., OTT, R.S. GUSTAFSON, B.K., KORITZ, G.D. and DAVIS L.E. (1985). Pharmacokinetic parameters and plasma protein binding of florfenicol (Sch 25298) in cattle. *Abstracts of Papers Presented at the 66th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease.* Abstract **85**(16).

- BRETZLAFF, K.N. (1986). Distribution of chloramphenicol in the bovine genital tract and pharmacokinetic studies of florfenicol in cattle. *Dissertation Abstracts International* **47**(3), 957.
- BRETZLAFF, K.N., NEFF-DAVIS, C.A., OTT, R.S., KORITZ, G.D., GUSTAFFSON, B.K. and DAVIS, L.E. (1987). Florfenicol in non-lactating dairy cows: pharmacokinetics, binding to plasma proteins, and effects on phagocytosis by blood neutrophils. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **10**, 233-240.
- BROZ, J. and FRIGG, M. (1987). Incompatibility between lasalocid and chloramphenicol in broiler chicks after a long term simultaneous administration. *Veterinary Research Communications* **11**, 159-72.
- BURNS, L.E., HODMAN, J.E. and CASS, A.B. (1959). Fatal circulatory collapse in premature infants receiving chloramphenicol. *New England Journal of Medicine* **261**, 1318-1321.
- BURNS, J.L., MENDELMAN, P.M. and LEVY, J. (1985). A permeability barrier as a mechanism of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**, 46-54.
- BURROWS, G.E., BARTO, P.B. MARTIN, B. and TRIPP, M.L. (1983). Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin and tylosin. *American Journal of Veterinary Research* **44**, 1053-1057.
- BURROWS, G.E., McALLISTER, C.G., TRIPP, P. and BLACK, J. (1989). Interactions between chloramphenicol, acepromazine, phenylbutazone, rifampin and thiamylal in the horse. *Equine Veterinary Journal* **21**(1), 34-38.
- BUSBY, M. and LESKO, L.J. (1987). Pharmacokinetic interaction between theophylline and chloramphenicol in rats. *Drug Metabolism* **15**(2), 204-6.
- CAMPOLI-RICHARDS, D.M., MONK, J.P., PRICE, A., BENFIELD, P., TODD, P.A. and WARD, A. (1988). Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* **35**, 373-447.
- CANNON, M., HARFORD, S. and DAVIES, J. (1990). A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol, and some fluorinated derivatives. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **26**, 307-317.
- CIFONE, M.A. (1983). Mutagenicity evaluation of Sch 25298 in the mouse lymphoma forward mutation assay. *Research Report n° D-16766*.
- CLARK, C.H. (1978). Clinical uses of chloramphenicol. *Modern Veterinary Practice* **59**, 889-894.

CLARK, B. (1980). The elongation step of protein biosynthesis. *Trends in Biological Sciences* **5**, 207-210.

CRAIG, W.A. and WELLING, P.G. (1977). Protein binding of antimicrobials: clinical, pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clinical Pharmacokinetics* **2**, 252-268.

CRAIG, W.A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 1-12.

CRONWALL, R., BROWN, M.P., MERRITT, A.M. and STONE, H.W. (1986). Body fluid concentrations and pharmacokinetics of chloramphenicol given to mares intravenously or by repeated gavage. *American Journal of Veterinary Research* **47**, 2591-2595.

CUTLER, D.J. (1978). Theory of mean absorption time, an adjunct to conventional bioavailability studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **30**, 476-478.

CHIN, N.X. and NEU, H.C. (1984). Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**, 1113-1118.

DAVIES, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375-382.

Decisión de la Comisión de 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (DOCE serie L de 17.8.2002).

DEL GIACCO, G.S. (1981). Fatal bone marrow hypoplasia in a shepherd using chloramphenicol spray. *Lancet*, i, 945.

DE HAAS, V., LOOCKWOOD, P.W., KATZ, T. and VARMA, K.W. (1995). Efficacy of florfenicol in the treatment of bovine respiratory disease, results of clinical trials in Europe. *Praktische-Tierarzt* **76**(9), 803-807.

Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de Noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios (DOCE serie L de 28.11.2001).

Directiva 2004/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de Marzo de 2004 que modifica la Directiva 2001/82/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios (DOCE serie L de 30.4.2004).

DOERN, G.V., JORGENSEN, J.H., THORNSBERRY, C., PRESTON, D.A., TUBERT, T., REDDING, J.S. and MAHER, L.A. (1988). National collaborative

study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **32**, 180-185.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA) Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) (1995). *Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods*. EMA/CVMP/036/95. London, EMA. pp 1-37.

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.

EUROPEAN COMMISSION (1999). European Commission Regulation Number 2385/99 amending Annex I-IV of Council Regulation Number 2377/90, laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities* **L288**, p. 14.

EUROPEAN COMMISSION (2002). European Commission Regulation Number 1181/02 amending Annex I-IV of Council Regulation Number 2377/90, laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities* **L172**, p. 13.

ERLICH, J., BARTZ, Q.R., SMITH, R.M., JOSLYN, D.A. and BURKHOLDER, P.R. (1947). Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science* **106**, 417-419.

EVERETT, D.J. (1991). Sch 25298: 104 week oral carcinogenicity study in Mice. *Research Report n° A-24921*, pp. 887.

EVERETT, D.J. (1991). Sch 25298 104 week oral toxicity study in Rats with 52 week interim kill: Results from the 104 week kill Rats. *Research Report n° A-25233*, pp.1082.

FEDER, H.M. (1981). Chloramphenicol: a review of its use in clinical practice. *Reviews of Infectious Diseases* **3**, 479.

FELICE, L., ABDENNEBI, H. and ASHRAF, M. (1988). Determination of thiamphenicol in bovine plasma by liquid chromatography. *Journal Association of Official Analytical Chemists* **71**, 1156.

FERNANDEZ-MUÑOZ, R., MONRO, R.E., TORRES-PINEDO, R. and VAZQUEZ, D. (1971). Studies on the chloramphenicol, lincomycin and erythromycin sites. *European Journal of Biochemistry* **23**, 185-193.

FERRARI, V., FRIGERIO, G., LODOLA, E. and SPEROTTI, L. (1967). Thiamphenicol: Experimental and clinical bases of a new antibiotic. *Bresso*

(Milan) and Vicenza: Zambon SpA.

FERRARI, V and PAJOLA, E. (1981). Types of haemopoietic inhibition by chloramphenicol and thiamphenicol. *Raven Press, N.Y.*, 43-59.

FERRARI, V. (1984). Salient features of thiamphenicol: review of clinical, pharmacokinetics and toxicology. *Sexually Transmitted Diseases*, **11**, 336.

FINLAND, M. (1970). Changing ecology of bacterial infection as related to the antibacterial therapy. *Journal of Infectious Diseases* **122**, 419-431.

FUGLESANG, J. and BERGAN, T. (1982). Chloramphenicol and thiamphenicol. *Antibiotic Chemotherapy* **31**, 1-21.

FINLAND, M. (1970). Changing ecology of bacterial infection as related to the antibacterial therapy. *Journal of Infectious Diseases* **122**, 419-431.

FREEMAN, K.B., PATEL, H. and HALDAR, D. (1977). Inhibition of DNA synthesis in Ehrlich ascites cells by chloramphenicol. *Molecular Pharmacology* **13**(3), 504-511.

FREIRE, A.C., ALMEIDA, A.P. and SOUZA, R. (1977). Some aspects of the thiamphenicol-pentobarbital interaction. *Pharmacological Research Communications* **9**(5), 447-54.

FUKUI, H., FUJIHARA, Y. and KANO, T. (1987). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of florfenicol against fish pathogens. *Fish Pathology* **22**(4), 201-207.

GAFFNEY, D.F. and FOSTER, T.J. (1978). Chloramphenicol acetyltransferase determined by R plasmids from gram-negative bacteria. *Journal of Genetic Microbiology* **109**, 351-358.

GAMEZ, A., PEREZ, Y., MARTI, G., CRISTOFOL, C. and ARBOIX, M. (1992). Pharmacokinetics of thiamphenicol in veal calves. *British Veterinary Journal* **148**(6), 535-539.

GAZZANIGA, A., PEZZOTTI, E. and COTTA, R.A. (1973). A rapid gas-chromatographic method for the determination of thiamphenicol in body fluid and tissues. *Journal of Chromatography* **81**, 71-77.

GIBALDI, M., NAGASHIMA, R. and LEVY, G. (1969). Relationship between drug concentration in plasma or serum and amount of drug in the body. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **58**, 193-197.

GILMAN, A.G., GOODMAN, L.S. and GILMAN, A. (1980). Antimicrobial agents. *In the Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eds. Goodman Gilman. 6th edn, pp. 21. McGraw-Hill, New York.

GOBURHUN, R. (1990). Sch 25298: 13 week oral toxicity study in Dogs with a 4 week recovery period. *Research Report n° A-23805*, pp. 220.

GONGZHENG, H.U. and LI, Y. (2003). Postantibiotic effect of florfenicol. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **26** (Suppl. 1), 217.

GOODMAN, A., HARDMAN, J.G., MOLINOFF, P.B., LIMBIRD, L.E. and RUDDON, R.W. (1996). Antimicrobial agents. *In the Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eds. Goodman Gilman. 6th edn., pp. 1131-1132. McGraw-Hill, New York.

GRAHAM, R., PALMER, D. PRATT, B.C. and HART, C.A. (1988). *In vitro* activity of florfenicol. *European Journal of Clinical Microbiological Infectious Diseases* **7**, 691-692.

GREENOUGH, R. and GOBURDHUN, R. (1987). Sch 25298: 4 weeks oral dose range finding study in dogs. *Research Report n° A-21468*, pp. 50.

GOH, K. (1979). Chloramphenicol and chromosomal morphology. *Journal of Medicine* **10**, 159-166.

GOLDSTEIN, E.J.C. and CITRON, D.M. (1988). Comparative activities of cefuroxime, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacin and ofloxacin against aerobic and anaerobic bacteria isolated from bile wounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**, 1143-1148.

GROVE, D.C. and RANDALL, W.A. (1955). Assay methods of Antibiotics. *Medical Encyclopedia Inc.*, New York.

HADDAD, N.S., RAVIS, W.R., PEDERSOLI, W.M. and CARSON, R.L. (1986). Pharmacokinetics of gentamicin given by intravenous and intramuscular routes to lactating cows. *American Journal of Veterinary Research* **47**, 808-813.

HALPERT, J. (1982). Further studies of the suicide inactivation of purified rat liver cytochrome P-450 by chloramphenicol. *Molecular Pharmacology* **21**, 166-172.

HEKTOEN, H., BERGE, J.A., HORMAZABAL, V. and YNESTAD, M. (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* **133**(3-4), 175-184.

HERRADORA, L.M.A. and MARTÍNEZ-GAMBA, R. (2003). Effect of oral enrofloxacin and florfenicol in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1. *Journal of Veterinary Medicine* **50**, 259-263 .

HERZOG, C. (1976). Drug treatment of typhoid fever. *Britanic Medical Journal* **2**, 941.

HOLMSTROM, L.M. (1988). Sch: 25298: Micronucleus test in bone marrow of CD-1 Mice. *Research Report n° D-23052*, pp. 31.

HORMAZABAL, V., STEFFENAK, I. and YNDESTAD, M. (1993). Simultaneous determination of residues of florfenicol and florfenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **616**, 161-165.

HORSBERG, T.E., MARTINSEN, B. and VARMA, K.J. (1994). The disposition of ^{14}C -florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **122**, 97-106.

HORSMANDORFER, S. and BAUER, J. (1996). Resistance pattern of bovine *Pasteurella*. *Berlin und Munchen Tierarz Wochenschr* **109**(5), 168-71.

HUBER, W.G. (1965). Chloramphenicol and other antibacterial substances. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 3rd edn. Iowa State University Press, Ames, IA.

HYATT, J.M., MAKINNON, P.S., ZIMMER, G.S. & SCHENTAG, J.J. (1995). The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *Clinical Pharmacokinetics* **28**, 143-160.

IVETT, J.L. (1990). Mutagenicity test on Sch 25298 in the mouse bone marrow cytogenetic assay. *Research Report n° D-23845*, pp. 39.

JACKSON, S.F., WENTZELL, B.R., McCALLA, D.R. (1977). Chloramphenicol damages bacterial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **78**, 151-157.

JIANG, H.X., FUNG, K.F., ZENG, Z.L. and CHEN Z.L. (2003). Pharmacokinetics of florfenicol in pigs after different administration routes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **26** (Suppl. 1), 96.

JIANZHONG, S., XIUBO, L., HAIYANG, J. and WALTER, H.H. (2004). Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in healthy sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **27**, 163-168.

KAPUSNIK-UNER, J.E., SANDE, M.A. and CHAMBERS, H.F. (1996). Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. *In the pharmacological Basis of Therapeutics*. Eds. Goodman & Gilman's. 9th edn., pp. 1130-1135. McGraw-Hill, New York.

KAYA, S., DOGAN, A. and BILGILI, A. (1991). Effects of chloramphenicol on anaesthesia induced by pentobarbital. *Veteriner Fakultesi Dergisi* **38**(1-2), 186-198.

KAYSER, F.H. and WURST, J. (1974). Resistance of gram-positive bacteria to

chloramphenicol/thiamphenicol occurrence and genetic basis. *Postgraduate Medical Journal* **50**, 79-83.

KEEN, P.M. (1979). Pharmacokinetics of antibacterial agents in the dog and cat. In *pharmacological basis of Small Animal Medicine*. Eds. Yoxal, A.T., Hird, J.F.R. Oxford, England. Scientific Publications, pp. 63-84.

KEIZER, G. (1974). Cooperative study of patients treated with thiamphenicol. Comparative study of patients treated with chloramphenicol and thiamphenicol. *Postgraduate Medical Journal* **50**, 132-145.

KENNEDY, J.F., ISBORG, C.D. and MICHAELS, R.H. (1980). Meningitis due to *Haemophilus influenzae* Type B resistant to both ampicillin and chloramphenicol. *Pediatrics* **66**, 14-16.

KEUKENS, H.J., BEEK, W.M.J. and AERTS, M.M.L. (1986). High performance liquid chromatographic screening and confirmation methods for chloramphenicol residues in meat with off-line cartridge sample clean-up and on-line diode array UV-Vis detection. *Journal of Chromatography* **352**, 445-453.

KIM, E.H. and AOKI, T. (1993). Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmids of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. *Microbiology and Immunology* **37**(2), 103-9.

LADEFOGED, O. (1979). Pharmacokinetics of antipyrine and trimethoprim in pigs with endotoxin induced fever. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **2**, 209-214.

LAINÉ, C.P., CAILLEUX, A. and ALLAIN, P. (1997). Mechanisms of the inhibition of human erythrocyte pyridoxal kinas by drugs. *Biochemical Pharmacology* **54**(8), 863-70.

LAVY, E., ZIV, G., GLICKMAN, A. and BEN-ZVI, Z. (1991). Single-dose pharmacokinetics of thiamphenicol in lactating goats. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum* **87**, 99-102.

LAVY, E., ZIV, G., SOBACK, S., GLICKMAN, A. and WINKLER, M. (1991). Clinical pharmacology of florfenicol in lactating goats. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum* **87**, 133-136.

LEDDY, I.A. (1988). Chromosomal aberrations assay with Chinese hamster ovary cells in vitro. *Research Report n° D-23053*, pp. 43.

LEES, P. and ALIABADI, F.S. (2002). Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**, 269-284.

LIU, J., FUNG, K., CHEN, Z., ZENG, Z. and ZHANG, J. (2003).

Pharmacokinetics of florfenicol in healthy pigs and in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 820-823.

LOBELL, R. (1991). Florfenicol CMI's from Ohio State. *Memo 602*, June 11.

LOBELL, R.D., VARMA, K.J., JOHNSON, J.C., SAMS, R.A. and GERKEN, D.F. (1994). Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **17**(4), 253-258.

LOOCKWOOD, P.W.D., HAAS DE, V. and KATZ, T.M.S. (1996). Clinical efficacy of florfenicol in the treatment of shipping fever in cattle in the USA. *Medicina Veterinaria* **13**(1), 34-38.

LUTHGEN, W. (1978). Salmonella infection in birds of prey. *Praktica Tirarzt* **59**, 663-666.

MANNA, G.K. and BARDHAN, S. (1973). Effects of two antibiotics on the chromosomes and mitotic frequency in the bone marrow cells of mice. *Chromosomes to day* **4**, 277-282.

MANNA, G.K. and BARDHAN, S. (1977). Some aspects of chloramphenicol induced bone marrow chromosome aberration in mice. *Journal of Cytology Genetics* **12**, 10-17.

MANYAN, D.R. and YUNIS, A.A. (1970). The effect of chloramphenicol treatment of ferrochelatase activity in dogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **41**, 926-931.

MANYAN, D.R., ARIMURA, G.K. and YUNIS, A.A. (1972). Chloramphenicol-induced erythroid suppression and bone marrow ferrochelatase activity in dogs. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **79**, 137-144.

MANYAN, D.R., ARIMURA, G.K. and YUNIS, A.A. (1975). Comparative metabolic effects of chloramphenicol analogues. *Molecular Pharmacology* **11**, 520-527.

MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., RÍOS, A., MARTÍNEZ, M.A., MARTÍNEZ, M. and ANADÓN, A. (2003). Oral bioavailability of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **26** (Suppl. 1), 115.

MARTINSEN, B., HORSBERG, T.E., VARMA, K.J. and SAMS, R. (1993). Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon in seawater at 11°C. *Aquaculture* **112**(1), 1-11.

MAZLUM, Z., PICKLES, R.W., PRADELLA, G. and PAGNANI, R. (1985).

Interaction between monensin, narasin and salinomycin and the antibiotics erythromycin, chloramphenicol or tylosin in broiler chicks. *Clinica Veterinaria* **108**(2), 95-104.

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.

McCHESNEY, E.W., KOSS, R.F., SHEKOSKY, J.M. and DEITZ, W.H. (1960). Metabolism of dextrosulphenidol in several animal species. *Journal of the American Pharmaceutical Association* **49**, 762-766.

McDERMOTT, P.F., BARRY, A.L., JONES, R.N., STEIN, G.E., THORNSBERRY, C.C.W. and WALKER, R.D. (2001). Standardization of broth microdilution and disk diffusion susceptibility tests for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus somnus*: Quality control standards for ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, gentamicin, penicillin, tetracycline, tilmicosin, and trimethoprim-sulfamethoxazole **39**, 4283-4287.

McKELLAR, Q.A. and VARMA, K.J. (1996). Pharmacokinetics and tolerance of florfenicol in Equidae. *Equine Veterinary Journal* **28**(3), 209-213.

McKENZIE, M.M. and BAINES, B.S. (1974). The effect of antibacterials on experimentally induced *Salmonella typhimurium* infection in chickens. *Poultry Science* **53**, 307-310.

McLEAN, I.W., SCHWAB, J.L. and HILLEGAS, A.B. (1940). Susceptibility of microorganisms to chloramphenicol. *Journal of Clinical Investigations* **28**, 953-963.

McLEOD, T.F., MANYAN, D.R. and YUNIS, A.A. (1977). The cellular transport of chloramphenicol and thiamphenicol. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **90**, 347-353.

MERCER, H.D., HEATH, G.E. and LONG, P.E. (1978). Drug residues in food animals. I. Plasma and tissue kinetics of chloramphenicol in young crossbred swine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **1**, 19-36.

[www] <http://www.merckvetmanual.com/> (24/09/02).

MESTORINO, N., LANDONI, M.F., ALT, M. and ERRECALDE, J.O. (1993). The pharmacokinetics of thiamphenicol in lactating goats. *Veterinary Research Communications* **17**, 295-303.

MILLER, A.M., GROSS, M.A. and YUNIS, A.A. (1980). Heterogeneity of human colony forming cells (CFU-C) with respect to their sensitivity to chloramphenicol. *Experimental Hematology* **8**, 236-242.

- MITCHEL, I.G., DIXON, P.A., GILBERT, P.J. and WHITE D.J. (1980). Mutagenicity of antibiotics in microbial assays problems of evaluation. *Mutation Research* **79**, 91-105.
- MITUS, W.J., and COLEMAN, N. (1970). *In vitro* effect of chloramphenicol on chromosomes. *Blood* **35**, 689-694.
- MYHR, B.C. and BRUSICK, D.J. 1983. Evaluation of Sch 25298 in the primary rat hepatocyte unscheduled DNA synthesis assay. *Research Report N° D-17050*, pp. 39.
- NAGABHUSAN, T.L., KANDASAMY, D., TSAI, H., TURNER, W.N. and MILLER, G.H. (1980). Novel class of chloramphenicol analogs with activity against chloramphenicol-resistant and chloramphenicol-susceptible organisms. *Current Chemotherapy and Infectious Disease Volume 1. Proceedings of the 11th International Congress of Chemotherapy and the 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*
- NAGAO, T. and MAUER, A.M. (1969). Concordance for drug induced plastic anemia in identical twins. *New England Journal of Medicine* **281**, 7-11.
- NAGATA, T., SAEKI, M., NAKAZAWA, H., FUJITA, M. and TAKABATAKE, E. (1985). Determination of residual thiamphenicol in chicken by high performance liquid chromatography. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **26**(1), 46-49.
- 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.
- NAGATA, T. and SAEKI, M. (1992). Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* **15**(12), 2045-2056.
- NEU, H.C. and KWUNG, P.F. (1980). *In vitro* activity of chloramphenicol and thiamphenicol analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**, 311-316.
- NODA, A. (1988). Reverse mutation test of Florfenicol in bacteria. *Research Report n° D-23050*.
- NODA, A. (1988). Reverse mutation test of Florfenicol in bacteria (collected cell agar-overlay method). *Research Report n° D-23051*.
- NORDMO, R., VARMA, K.J. SUTHERLAND, I.H. and BROKKEN, E.S. (1994). Florfenicol in Atlantic salmon: field evaluation of efficacy against furunculosis in Norway. *Journal of Fish Diseases* **17**(3), 239-244.

- NOUWS, J.F. and ZIV, G. (1982). Pharmacological aspects of chloramphenicol administration by the intramammary route to lactating dairy cows. *The veterinary Quarterly* **4**, 23-31.
- ONIVIRAN, O. (1974). The comparative efficacy of some antibiotics used to treat experimentally induced mycoplasma infection in goats. *Veterinary Record* **94**, 418.
- OTSUKA, K., HORIBE, K., SUGITANI, A. and YAMADA, F. (1986). Determination of residual thiamphenicol in yellow tail by high performance liquid chromatography. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **27**(3), 263-266.
- OSAWA, S., TAKATA, R. and TAMKI, M. (1973). Chloramphenicol resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Molecular General Genetics* **127**, 163-173.
- PAAPE, M.J. and MILLER, R.H. (1990). Effects of florfenicol, thiamphenicol and chloramphenicol on phagocytosis, chemiluminescence and morphology of bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Dairy Science* **73**, 1734-1744.
- PANT, G.S., KAMADA, N. and TANAKA, R. (1976). Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of atomic bomb survivors and of normal individuals exposed to radiation and chemical agents. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* **25**, 99-105.
- PARKER, R.M. and SHAW, I.O.C. (1988). Determination of chloramphenicol in tissues. Problems with *in vitro* metabolism. *Analyst* **113**, 1875-1876.
- PERRY, C.J., ATKINSON, C., HUDSON, P. and FINCH, J. (1987). Sch 25298: 4 weeks oral toxicity study in rats. *Research Report n° A-21504*, pp. 122.
- PEERY, C.J. (1990). Sch 25298: 13 week oral toxicity study in Rats with a 4 week recovery period. *Research Report n° A-23493*, pp. 208.
- PESTKA, S. (1971). Inhibitors of ribosome function. *Annual Review of Microbiology* **25**, 487-562.
- PHUKAN, A., KALITA, C.C. and DUTTA, G.N. (1989). Treatment of experimental colibacillosis in chickens. *Indian Journal of Veterinary Medicine* **9**(2), 139-141.
- PIFFARETTI, J.C. and FROMENT, Y. (1978). Binding of chloramphenicol and its acetylated derivatives to *Escherichia coli* ribosomal subunits **24**, 24-28.
- PILLOUD, M. (1973). Pharmacokinetics, plasma protein binding and dosage of chloramphenicol in cattle and horses. *Research in Veterinary Science* **15**, 231-238.

PLOMP, T.A., SCHALKHAUSER, K.M. and MAES, R.A. (1981). Penetration into human urogenital tissues, muscle tissues, rib and cerebrospinal fluid of thiamphenicol. *Arzneimittelforschung* **31**, 1165-1168.

POULSEN, H.E. and LOFT, S. (1988). Antipyrine as a model drug to study hepatic drug-metabolizing capacity. *Journal of Hepatology* **6**, 374-382.

POWELL, D.A., NAHATA, M.C., DURREL, D.C., GLAZER, J.P. and HILTY, M.D. (1981). Interactions among chloramphenicol, phenytoin and phenobarbital in a pediatric patient. *Journal of Pediatrics* **98**, 1001-1003.

POWERS, T.E., VARMA, K.J., HOUESHELL, J.W., LAMENDOLA, J.F. and LOBELL, R.D. (1986). Pharmacokinetics of florfenicol in feeder calves. *Proceedings of the 14th World Congress Diseases of Cattle, Dublin* **2**, 1316-1319.

PRAMANIK, P. and MITRA, C. (1995). Mechanism of chloramphenicol-induced modulation of mouse ileal motility. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* **48**(2), 89-101.

PRESCOTT, J.F. (1984). Antimicrobial drug susceptibility of bacteria isolated from disease process in cattle, horses, and dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal* **25**, 289.

PRESCOTT, J.F. and BAGGOT, J.D. (1991). Chloramphenicol and Thiamphenicol. In Prescott and Baggot's. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 1st Ed. pp. 213-223. Ed. Acribia.

PRESCOTT, J.F., BAGGOT, J.D. and WALKER, R.D. (2000). Chloramphenicol and Thiamphenicol. In Prescott and Baggot's. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3rd Ed. pp. 264-266.

PRIEBE, S. and SCHWARZ, S. (2003). *In vitro* activities of florfenicol against bovine and porcine respiratory tract pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47**, 2703-2705.

RADETSKY, M.S., ISTRE, G.R., JOHANSEN, T.L. and LAVER, B.A. (1981). Multiply resistant *pneumococcus* causing meningitis. Its epidemiology within a day-care center. *Lancet* **2**, 771-773.

RAHAL, J.J. and SIMBERKOFF, M.S. (1979). Bactericidal and bacteriostatic action of chloramphenicol against meningeal pathogens. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **16**, 13-18.

RANG, H.P. and DALE, M.M. (1991). Absorption, distribution and fate of drugs in pharmacology. Eds. H.P. Rang and M.M. Dale. Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 72-109.

- RATZAN, R.J., MOORE, M.A. and YUNIS, A.A. (1974). Effect of chloramphenicol on the *in vitro* colony-forming cell. *Blood* **43**, 363-369.
- REICHE, R., MULLING, M. and FREY, H. (1980). Pharmacokinetics of chloramphenicol in calves during the first weeks of life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **3**, 95-106.
- RIEGELMAN, S. and COLLIER, P. (1980). The application of statistical moment theory to the evaluation of *in vivo* dissolution time and absorption time. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **8**, 509-515, 521-525.
- RIGDON, R.H., CRASS, G. and MARTIN, N. (1954). Anemia produced by chloramphenicol in the duck. *Archives of Pathology* **58**, 85-93.
- RIGDON, R.H., MARTIN, N. and CRASS, G. (1955). Consideration of mechanism of anemia produced by chloramphenicol in the duck. *Antibiotics and Chemotherapy* **5**, 38-44.
- RÍOS, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. and ANADÓN, A. (1997). Plasma disposition of florfenicol in broiler chickens following intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Proceedings of the 7th European Association for Veterinary Pharmacology & Toxicology (EAVPT) International Congress **20**(1), 182.
- ROBERTS, M.C., SWENSON, C., OWENS, L. and SMITH, A.L. (1980). Characterization of chloramphenicol resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2**, 199-207.
- ROSENKRANZ, H.S. (1988). Chloramphenicol: magic bullet or double-edge sword?. *Mutation Research* **196**, 1-16.
- SHAW, W.V. (1971). Comparative enzymology of chloramphenicol resistance. *Annual N.Y. Academy Science* **182**, 234-242.
- SAMS, R.A. (1994). Florfenicol: chemistry and metabolism of a novel broad spectrum antibiotic. *Proceedings XVIII World Buiatrics Congress*, 16.
- SANDE, M.A. and MANDELL, G.L. (1993). Antimicrobial agents. *In the Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eds. Goodman Gilman, A., Rall, T.W., Nies, A.S. and Taylor, P. 8th edn., pp. 1117-1145. McGraw-Hill, New York.
- SANDERS, J.E., YEARY, R.A., FENNER, W.R. and POWERS, J.D. (1979). Interaction of phenytoin with chloramphenicol or pentobarbital in the dog. *Journal of Veterinary Medical Association* **175**(2), 177-80.
- SASAKI, M.S. and TONOMURA, A. (1973). High susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer*

Research **33**, 1829-1836.

SCHWARTZ, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Annales of Statistique* **6**, 461-464.

SHEINER, L.B. (1981). ELSFIT a program for the extended least squares fit to individual pharmacokinetic data. *A technical report of the division of Clinical Pharmacology*, University of California, San Francisco, CA, U.S.A..

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.

SHEPPARD, M.E., BEATTIE, M.J. and JOHNSON, C.K. (1994). Efficacy of Aquaflor premix against furunculosis in Atlantic salmon smolts in British Columbia. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* **2**, 51-53.

SHIN, J.S., JIN, S.K., SHIN, S.W., RAYAMAJHI, H.S., YOO, H.S., RHA, J.S. (2004). Minimum inhibitory concentration of florfenicol (Nuflor) to *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, and *B. bronchiseptica* isolated from pigs in Korea. *Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany* **2**, 560.

SINGER, C.J. and KATZ, S.E. (1985). Microbiological assay for chloramphenicol residues. *Journal Association of Official Analytical Chemists* **68**(5), 1037-1041.

SIGNORINI, G., G., BONANOMI, L., LONGO, A. and MONDELLINI, A. (1985). Blood pharmacokinetics of thiamphenicol in cattle. *Atti della Societa Italiana di Buiatria* **17**, 311-315.

SIGNORINI, G., FERRARI, A., BALLARINI, G., BONANOMI, L. and MONDELLINI, A. (1986). Plasma levels and mammary excretion of thiamphenicol in cattle. *Obiettivi del Documenti Veterinari* **7**(11), 61-63.

SISODIA, C.S., DUNLOP, R.H. and GUPTA, V.S. (1973). A pharmacologic study of chloramphenicol in cattle. *American Journal of Veterinary Research* **4**, 1147-1151.

SKOLIMOWSKI, I.M., KNIGHT, R.C. and EDWARDS, D.I. (1983). Molecular basis of chloramphenicol and thiamphenicol toxicity to DNA *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **12**, 535-542.

SMITH, A.L. and WEBER, A. (1983). Pharmacology of chloramphenicol. *Pediatric Clinic of North America* **30**, 209-236.

SMITHERMANN, P., McLINTOCK, R. and GOOSENS, L. (1998). Clinical experience with florfenicol (Nuflor) in the treatment of respiratory and enteric diseases in calves. *Tierärztliche Umschau* **53**(10), 620-623.

SOBACK, S. (1988). Therapeutic success or failure in mastitis therapy: a pharmacokinetic approach. *Israel Journal of Veterinary Medicine* **44**, 233-243.

SOBACK, S., PAAPE, M.J., FILEP, R. and VARMA, K.J. (1995). Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **18**, 413-417.

SOLIMAN, Z.I. (1989). Some pharmacokinetic aspect of kitasamycin in broiler chickens. *M.V.Sc. Thesis*, Cairo University.

SOMPOLINSKY, D. and SAMRA, Z. (1968). Mechanism of high-level resistance to chloramphenicol in different *E. Coli* variants **50**, 55-56.

STRAKOVA, J., DVORAK, M. and SEVCIK, B. (1980). Toxicity of chloramphenicol in chickens when administered chronic in sol. *Biology Chemistry and Veterinary* **16**, 255-264.

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.

SYRIOPOULOU, V.P., HARDING, A.L., GOLDMAN, 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.

UEDA, Y. and SUENAGA, I. (1995). *In vitro* Antibacterial activity of Florfenicol against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Veterinary Medicine Science* **57**, 363-364.

UEDA, Y., OHTSUKI, S. and NARUKAWA, N. (1995). Efficacy of florfenicol on experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *Journal of Veterinary Medical Sciences* **57**(2), 261-265.

UESUGI, T. IKEDA, M. HORI, R. KATAYAMA, K. and ARITA, T. (1974). Metabolism of thiamphenicol and comparative studies of its urinary and biliary excretion with chloramphenicol in various species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **22**, 2714-2722.

VAN BEERS, D., SCHOUTENS, E., VANDEELINDEN, M.P. and YOURRASSOWKY, E. (1975). Comparative in vitro activity of chloramphenicol and thiamphenicol on common aerobic and anaerobic gram-negative bacilli (*Salmonella* and *Shigella* excluded). *Chemotherapy* **21**, 73-81.

VAN DER LEE, J.J., NOWS, J.F.M. and BLOEMENDAL, F.W.R. (1982). Physicochemical methods for pharmacokinetic and residue analysis of chloramphenicol and degradation products in dairy cows. *Journal of Veterinary*

Pharmacology and Therapeutics **5**, 161-175.

VARMA, K.J., LAMENDOLA, J.F., POWERS, T.E. and ADAMS, P.E. (1985). Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. *Abstracts of the Annual Meeting of the Conference Research Workers Annual Disease* (86).

VARMA, K.J., ADAMS, P.E., LOBELL, R.D., LAMENDOLA, J.F., HOUDESHHELL J.W. and POWERS, T.E. (1986). Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves and its *in vitro* antibacterial activity. *American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*.

VARMA, K.J., ADAMS, P.E., LAMENDOLA, J.F., POWERS, J.D. and POWERS, T.E. (1986). Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **9**, 412-425.

VARMA, K.J., ZIV, G. and SIMON, F. (1988). Pharmacokinetics and clinical efficacy of a new broad spectrum antibiotic florfenicol in veal calves. *Veterinary Pharmacology Toxicology and Therapeutics in Food Producing Animals*, 4th EAVPT, Hungary, **37**.

VARMA, K.J., SAMS, R.A., LOBELL, R.D. and LOCKWOOD, P.W. (1991). Pharmacokinetics and efficacy of a new broad spectrum antibiotic, florfenicol in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum* **87**, 102-104.

VARMA, K.J., WALKER, R.D., SAMS, R.A. HOLLAND, R.E. and TRENTI, F. (1994). Pharmacokinetics and distribution of florfenicol in bronchial secretions and tissue cage fluid in cattle. *Proceedings of the 18th World Buiatrics Congress*, Italy, 547-550.

[www] <http://vetgate.ac.uk/> (25/09/02).

VOORSPOELS, E., D'HAESE, B.A., and REMON, J.P. (1999). Pharmacokinetics of florfenicol after treatment of pigs with single oral or intramuscular doses or with medicated feed for three days. *Veterinary Record* **145**, 397-399.

WAGNER, J.G. (1975). *Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics*. 1st ed. Drug Intelligence Publications. Hamilton, Illinois.

WAGNER, J.G. (1976). Linear pharmacokinetic equations allowing direct calculation of many needed pharmacokinetic parameters from the coefficients and exponents of polyexponential equations which have been fitted to the data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **4**, 443-467.

WAL, J.M., PELERAN, J.C. and BORIES, G. (1979). Electron- capture detection of chloramphenicol using a heptafluorobutyrate derivative. Application to residues in milk. *Journal of Chromatography* **168**(1), 179-185.

- WAL, J.M., CORPET, D.E., PELERAN, J.C. and BORIES, G.F. (1983). Comparative metabolism of CAP in germ-free and conventional rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **24**, 89-94.
- WATSON, A.D.J. and McDONALD, P.J. (1976). Distribution of chloramphenicol in some tissues and extravascular fluids of dogs after oral administration. *American Journal of Veterinary Research* **37**(5), 557-559.
- WEISBLUM, B. and DAVIES, J. (1968). Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. *Bacteriology Review* **32**, 493-528.
- WETZLICH, S.E., LANE, V.M., VILLAROEL, A. and CRAIGMILL A.L. (2003). The pharmacokinetics of florfenicol in sheep after intravenous and subcutaneous dosing. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **26** (Suppl. 1), 99.
- WHITE, G. and PRIOR, S.D. (1982). Comparative effects of oral administration of trimethoprim / sulphadiazine or oxytetracycline on the faecal flora of horses. *Veterinary Record* **111**, 316-318.
- WIG, D. and BROWN, C.L. (1983). Comparison of the *in vitro* activities of SCH 25298 and chloramphenicol. *Research Report N° A-17211*.
- WILLIAMS, F. and WILKINS. Antibiotics in laboratory medicine. *Lorian V Baltimore* **19801**, 607-622.
- WILSON, D.J., SEARS, P.H., GONZALEZ, R.N., SMITH, B.S., SCHULTE, H.F., BENNETT, D.J., DAS, H.H. and JOHNSON, C.K. (1996). Efficacy of florfenicol treatment of clinical and subclinical bovine mastitis. *American Journal of Veterinary Research* **57**(4), 526-528.
- YAMOAKA, K., NAKAGAWA, T. and UNO, T. (1978). Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **6**, 165-175.
- YOUNG, R.R. (1988). Mouse lymphoma forward mutation assay with florfenicol. *Research Report n° A-22860*, pp. 24.
- YUNIS, A.A., and BLOOMBERG, G.R. (1964). Chloramphenicol toxicity: clinical features and pathogenesis. *Progress in Hematology* **4**, 138-159.
- YUNIS, A.A. (1969). Drug-induced bone marrow injury. *Advances in Internal Medicine* **15**, 357-376.
- YUNIS, A.A., SMITH, V.S. and RESTREPO, A. (1970). Reversible bone marrow suppression from chloramphenicol. *Archives of Internal Medicine* **126**, 272-275.

- YUNIS, A.A. (1973). Chloramphenicol induced bone marrow suppression. *Seminars in Hematology* **10**, 225-234.
- YUNIS, A.A., MANYAN, D.R. and ARIMURA, A.A. (1973). Comparative effect of chloramphenicol and thiamphenicol in mammalian cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **81**, 713-718.
- YUNIS, A.A., MANYAN, D.R. and ARIMURA, A.A. (1974). Comparative metabolic effects of chloramphenicol and thiamphenicol in mammalian cells. *Postgraduate Medical Journal* **50**, 60-64.
- YUNIS, A.A. and GROSS, M.A. (1975). Drug-induced inhibition of myeloid colony growth: protective effect of colony stimulating factor. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **86**, 499-504.
- YUNIS, A.A. and ADAMSON, J.W. (1977). Differential *in vitro* sensitivity of marrow erythroid and granulocytic colony forming cells to chloramphenicol. *American Journal of Hematology* **2**, 355-363.
- YUNIS, A.A., MILLER, A.M., SALEM, Z. and ARIMURA, G.K, (1980). Chloramphenicol toxicity: pathogenic mechanisms and the role of the p-NO₂ in aplastic anemia. *Clinical Toxicology* **71**, 359-373.
- YUNIS, A.A., MILLER, A.M., SALEM, Z. and ARIMURA, G.K, (1980). Nitroso-chloramphenicol: possible mediator in chloramphenicol-induced aplastic anemia. *Journal of Laboratory Chemical Medicine* **96**, 36-46.
- YUNIS, A.A. (1988). Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **28**, 83-100.
- ZHAO, J., KIM, E.H., KOBAYASHI, T. and AOKI, T. (1992). Drug resistance of *Vibrio anguillarum* isolated from Ayu between 1989 and 1991. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **58**(8), 1523-1527.
- ZIV, G., PAAPE, M.J. and DULIN, A.M. (1983). Influence of antibiotics and intramammary antibiotic products on phagocytosis of *S. aureus* by bovine leukocytes. *American Journal of Veterinary Research* **44**, 385-388.
- ZIV, G. (1986). Comparative minimal inhibitory concentrations of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol for pathogenic gram positive and gram negative bacteria isolated from animals and poultry. *Report*, Jan 14.
- ZIV, G., RISENBERG, R. and PAZ, R. (1987). Comparative *in vitro* activities of Florfenicol, Thiamphenicol and Chloramphenicol against pathogens isolated from farm animals. *Oral communication, XXIII World Veterinary Congress, Quebec, Canada.*
- ZIV, G., SOBACK, S., RISENBERG, R. and PAZ, R. (1987). Comparative

clinical pharmacology of Florfenicol, Thiamphenicol and Chloramphenicol in broilers. *Oral communication, XXIII World Veterinary Congress, Quebec, Canada.*

ZIV, G. (1988). Disposition and kinetics of florfenicol in the mammary glands of cows and ewes. *Program Abstracts of the 4th Congress EAVPT, Budapest, pp. 144.*