大韓獸醫學會誌(2010) 第50卷 第4號
Korean J Vet Res(2010) 50(4) : 279~284

<원 저>

Florfenicol-amoxicillin 혹은 florfenicol-cefuroxime 병용투여시 어류 병원성 세균에 대한 약역학

이은미 · 최명진 · 이승진 · 박승춘*

경북대학교 수의과대학

(게재승인: 2010년 9월 7일)

Pharmacodynamics of florfenicol alone and in combination with amoxicillin or cefuroxime against pathogenic bacteria of fish origin

Eun-Mi Lee, Myung-Jin Choi, Seung-Jin Lee, Seung-Chun Park*

College of veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Accepted: September 7, 2010)

Abstract : Combination therapy of antibiotics is leading to improved efficacy or safety profiles with decrease emergence of bacterial resistance. Because of this benefit, many of antibacterial combinations have been used in veterinary practice for the past few decades. The purpose of this study was to examine the *in vitro* activity of an amoxicillin alone and in combination with other antibiotics against pathogenic bacteria of fish origin. Based on the fractional inhibitory concentration (FIC) index (FIC ≦ 0.5), a synergistic interaction was shown in combination of florfenicol with amoxicillin or cefuroxime. The combination of florfenicol and amoxillin showed higher antibacterial activity than that of florfenicol and cefuroxime. Ratio of amoxicillin and florfenicol in combination was 1 : 1, which showed the antibacterial activity against bacterial isolates of fish as compared with other ratios. A synergetic effect of the combination (amoxicillin and florfenicol) was further confirmed in the time-kill curve study. The study showed a better *in vitro* antibacterial activity of a 1 : 1 combination of amoxicillin and florfenicol than the individual antibacterial against bacterial isolates of fish. In conclusion, the combination of florfenicol and amoxicillin may serve as a potential antibacterial therapy in fishes infected pathogenic bacteria.

Keywords : antibiotics, combination therapy, pharmacodynamic, synergism

서 론

항생제란 미생물이 생산하는 2차 대사산물로 저농도에서 다른 병원성 미생물의 성장을 억제 하거나 사멸시키는 저분자 물질을 말하며, 1928년 영국의 플레밍(Alexander Fleming)이 페니실린을 발견한 이후 사람과 동물에서 세균 감염증 치료 및 어류를 포함한 동물에서 성장촉진의 목적으로 사료첨가제로 사용하여 왔다.

현재 국내 축 · 수산용 항생제 사용량은 연간 약 1,200~1,500톤 정도 사용되고 있으며 국립수의과학검역원에서는 축산물 중의 안전성 확보 및 내성균 출현의 억제에 방지를 위하여 2009년 1월 1일부터는 총 17 종의 항생제를 허가하여 엄격하게 관리하고 있다 [1, 5]. 이에 따라, 수의임상에서 사용할 수 있는 항균제의 수는 점차 제한되고 있으며, 또한 신규 항생제 발견의 어려움으로 기존에 사용하던 항균제를 이용한 병용 투여에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 항균제의 병용 투여는 원인불명의 세균감염증을 치료하며, 단일약물 투여에 따른 독성을 감소시키고 두 항균제로 인한 항균범위를 넓힐 수 있는 복합제제의 개발이 중요하다 [7]. 두 항균제의 상

*Corresponding author
Tel: +82-53-950-5964, Fax: +82-53-950-5964
E-mail: parksch@knu.ac.kr

호작용으로 나타나는 일반적인 현상으로 정균제와 정균제는 상가작용, 살균제와 정균제는 길항작용 그리고 살균제와 살균제는 상승작용을 일으키는 것으로 알려져 있지만 실제로는 항균작용의 속도, 세균의 상태 그리고 대상동물에서 약동학에 따라 항균제의 작용은 달라지고 있다 [11]. 본 연구에서는 이러한 점을 착안하여 살균제와 살균제, 살균제와 정균제의 상호작용을 약역학적 관점에서 알아보고자 하였다. 살균제 중 amoxicillin(AM)과 cefuroxime(CRM)은 β-lactam계 항생물질로 병원균의 대수 증식기에 세포벽 mucopeptide의 생합성을 억제하여 세포벽을 파괴시키는 살균작용을 한다. 이러한 결과로 가축의 질병치료, 성장촉진을 위한 사료첨가제 그리고 양식 어류의 그람 양성균 및 음성균, 유결절증 그리고 절창병 등의 예방 및 치료에 광범위하게 사용되고 있다 [9]. 이에 반해 florfenicol(F)은 재생불량성빈혈(aplastic anemia)을 일으키는 chloramphenicol의 p-nitro group을 sulfonyl 그룹으로 치환하여 독성을 제거한 정균제에 속하며, thiamphenicol 유도체로 세균의 50s ribosomal subunit에 결합하여 단백 합성을 억제하여 세균의 증식을 억제한다 [2, 15].

본 연구에서는 이 F-AM 그리고 F-CRM 병용 투여에 대하여 병원성미생물에 대한 최소억제농도(minumum inhibitory concentration, MIC)와 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC)에 대한 항균활성, 분획별 억제농도(fractional inhibitory concentraion, FIC) 그리고 살균 속도(killing rate)에 대한 약역학적 시험을 수행하여, 항생제간의 상호작용을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

항생제 준비

본 시험에 사용한 3 종의 항균제는 대성미생물연구소(한국)에서 제공받은 AM, F 그리고 CRM 1 g을 멸균 증류수 9 mL에 녹여 실험에 사용하였다.

시험균주

본 시험에 사용한 균주는 국립수산과학원에서 분양받아 실험에 공하였으며 어류 미생물인 *Staphylococcus* (*S.*) *epidermidis*, *Pseudomonas*(*P.*) *piscicida*, *Lactococcus* (*L.*) *garvieae*, *Vibrio*(*V.*) *harveyi*, *Streptococcus*(*S.*) *parauberius*, *Edwardsiella*(*E.*) *tarda* 및 *Streptococcus*(*S.*) *iniae*는 Brain heart infusion broth를 이용하여 배양한 후 실험에 사용하였다.

MIC 및 MBC의 측정

MIC는 broth microdilution 방법을 사용하여 측정하였다. 대상 균주는 한천배지에 24시간 계대 배양하여 0.5 MacFarland(10^8 CFU/mL)로 농도를 조절하여 사용하였다. 항생제를 96 well microplate를 이용하여 256~0.125 μg/mL까지 희석한 후 대상균주를 접종하고 24시간 배양한 후 최소억제농도를 측정하였다. MBC는 96 well plate에서 균이 증식하지 않은 MIC 이상의 well의 배양액을 한천배지에 접종하여 30°C에서 배양하였다. 최소살균농도는 최초의 접종균수의 99.9%를 사멸하는 최대희석배수의 농도로 정하였다 [10, 13, 14].

FIC의 측정

AM과 F 그리고 AM과 CRM의 병용효과는 checkerboard 적정법을 이용하여 평가하였다. 대상균주들을 agar plate에서 24시간 계대 배양하여 0.5 McFarland(10^8 CFU/mL)로 농도를 조절하였으며, AM과 F 또는 CRM이 함유된 96 well plate에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 균주의 성장 여부를 확인하였다. 두 약제의 상호작용은 FIC index로 평가하였다. 일반적으로 항균제의 병합시 FIC ≤ 0.5인 경우 상승작용, 0.5 < FIC < 2 인 경우 상가작용(additive effect/indifference), FIC ≥ 2 이상인 경우 길항작용(antagonism)으로 판정한다. FIC를 구하는 식은 아래와 같다 [12].

$$\text{FIC index} = \frac{\text{병용시 MIC치(A약제)}}{\text{단체시 MIC치(A약제)}} + \frac{\text{병용시 MIC치(B약제)}}{\text{단체시 MIC치(B약제)}}$$

AM과 F 그리고 AM과 CRM의 복합제형에 대한 유효성 비교시험

AM과 F 그리고 AM과 CRM의 복합제형에 대한 유효성을 비교하기 위하여 중량 별 합제에 대하여 MIC 값을 비교하였다. 우선 F, AM, CRM의 단일 항균제와 F 75 g + AM 25 g, F 50 g + AM 50 g, F 25 g + AM 75 g과 동일하게 AM + CRM을 중량별로 혼합하여 각각 혼합제제에 대한 MIC를 상기의 방법으로 측정하였다.

AM과 F의 Killing rate curve

AM과 F의 복합제형을 이용하여 실시간으로 균을 죽이는 상호작용을 구명하고자 시험 균주를 agar plate에서 24시간 계대 배양하여 0.5 McFarland(10^8 CFU/mL)로 농도를 조절하여 50 mL cornical tube에 접종하고 각각의 배합으로 혼합된 항균제 용액을 첨가하여 어류세균을 30°C에서 진탕 배양하였다. 항균용액을 첨가 전과 첨가 후 0.5, 1, 2, 4, 8시간째 시료를 채취하여 멸균된 0.1% agar saline 용액으로 10배 단계별 희석법으로 희석한 후 tryptic soybean agar plate에 20 μL씩 도말하여 24시간 배

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of various antibiotics against pathogenic

Bacteria	AM (μg/mL)		CRM (μg/mL)		F (μg/mL)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Pseudomonas piscicida	0.5	4	0.5	16	4	128
Streptococcus parauberius	0.5	0.5	0.5	0.5	2	8
Staphylococcus epidermidis	0.5	4	1	64	2	64
Lactococcus garvieae	0.5	2	0.5	8	4	64
Edwardsiella tarda	128	128	4	32	1	16
Streptococcus iniae	0.5	0.5	0.5	0.5	1	8
Vibrio harveyi	0.5	0.5	0.5	2	8	8

Table 2. *In vitro* activity between amoxicillin (AM) and cefuroxime (CRM) against bacteria isolated from fish

Bacteria	Antibiotics	MIC (μg/mL)		
		Single	Combination	FIC index
Pseudomonas piscicida	AM	2	0.031	0.078
	CRM	1	0.063	
Streptococcus parauberius	AM	0.0625	0.031	1.5
	CRM	0.0625	0.063	
Staphylococcus epidermidis	AM	0.25	0.031	0.188
	CRM	1	0.063	
Lactococcus garvieae	AM	0.5	0.031	0.188
	CRM	0.5	0.063	
Vibrio harveyi	AM	2	0.031	0.047
	CRM	2	0.063	

FIC: fractional inhibitory concentration.

양한 후 균수를 측정하였다. 측정시 5개 이하, 300개 이상의 집락은 제외하고 측정하였다.

결 과

어류세균의 MIC 및 MBC 측정시험

어류 병원성세균 7종에 대하여 각 항생제의 MIC와 MBC 값을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 그 결과 AM의 경우 *E. tarda*를 제외한 어류 병원성 세균에 대하여 0.5 μg/mL의 MIC 값을 나타내었다. CRM의 경우 *S. epidermidis* 그리고 *E. tarda*에서 각각 1과 4 μg/mL의 MIC 값을 나타내었다. F의 경우 시험 균주에 대하여 전반적으로 1-8 μg/mL의 MIC 값 분포를 나타내었다.

AM과 기타 항생제와의 상호작용

어류 병원성 세균인 *P. piscicida*, *S. parauberius*, *S. epidermidis*, *L. garvieae* 및 *L. garvieae*에 대하여 amoxicillin과 기타 항생제와의 상호작용을 알아보기 위하여 checkerboard method를 사용하여 FIC 값을 구하였다. 먼저, AM + CRM의 경우 *S. parauberius*에서 FIC 지수값이 1.5으로 상가작용을 확인하였으며, 그 외의 균주에서 상승작용을 확인할 수 있었다(Table 2). AM과 F의 병합에 대한 결과를 Table 3에 나타내었다. *S. parauberius*에서 FIC 지수값이 0.563으로 상가작용을 나타내었으며, 이를 제외한 4 종의 어류 병원성 세균에서는 모두 상승작용이 나타났다. 이 중 더욱 높은 상승작용을 가지는 AM과 F의 복합제제를 이용하여 추가적으로 *E. tarda*와 *S. iniae*에 대한 상호작용을 알아본 결과, 각각 0.625, 0.188의 FIC값을 가졌으며, 상가와 상승작용을 나타내었다(data not shown).

배합비율에 따른 MIC

위의 FIC 지수값에 따른 항생제간의 상호 작용의 해석에 따라, AM과 F의 합제가 AM과 CRM의 합제보다 여러 어류 병원성 세균에 대하여 높은 상승작용을 가짐이 입증되었으므로, AM과 F의 합제를 선택하여 사용하였다. 적절한 배합비율을 설정하기 위해, 여러 가지 배

Table 3. *In vitro* activity between amoxicillin (AM) and florfenicol (F) against bacteria isolated from fish

Bacteria	Antibiotics	MIC (μg/mL)		FIC index
		Single	Combination	
Pseudomonas piscicida	AM	1	0.031	0.156
	F	1	0.125	
Streptococcus parauberius	AM	0.0625	0.031	0.563
	F	2	0.125	
Staphylococcus epidermidis	AM	0.5	0.031	0.078
	F	8	0.125	
Lactococcus garvieae	AM	0.5	0.031	0.094
	F	4	0.125	
Vibrio harveyi	AM	1	0.031	0.063
	F	4	0.125	

Table 4. Minimal inhibitory concentrations against in different ratios of amoxicillin (AM) - florfenicol (F) combination

Antibiotics	MIC (μg/mL)			
	Pseudomonas piscicida	*Edwardsiella tarda*	*Streptococcus iniae*	*Vibrio harveyi*
AM	1	4	0.5	1
F	4	1	2	4
AM75% + F25%	1	2	0.125	1
AM50% + F50%	2	1	0.125	2
AM25% + F75%	2	1	0.125	2

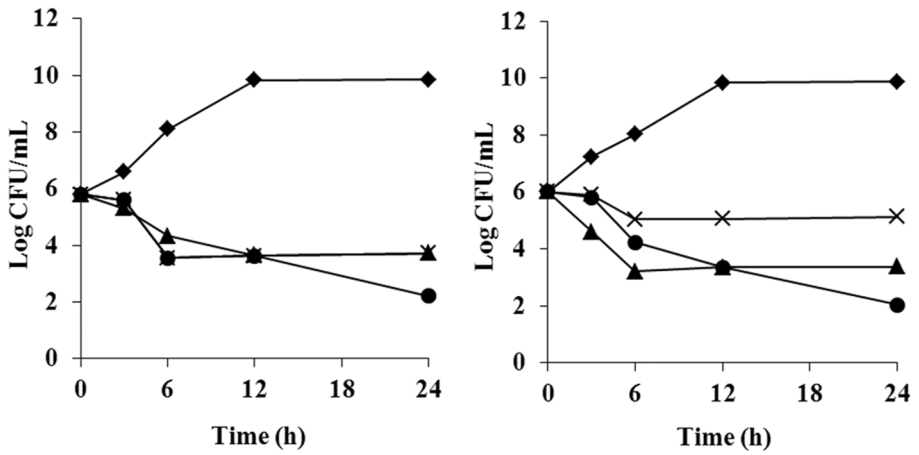

Fig. 1. Killing rate of amoxicillin (AM), florfenicol (F) or their combination against (A) *Edwardsiella tarda* and (B) *Streptococcus iniae*. -◆-: Control, -●-: AF, -▲-: AM, -×-: F.

합비율에 따른 MIC 값을 Table 4에 요약하였다. 여러 배합비율로 이루어진 합제의 MIC 값은 *P. piscicida*, *S. iniae* 및 *V. harveyi*의 경우에 단일 F 보다 MIC 값이 낮았으며 *P. piscicida*와 *V. harveyi*의 경우 AM 75% + F 25%에서 다른 배합비율과 비교하여 MIC 값이 낮은 경향을 보였다. *S. iniae*의 경우는 모든 비율에서 동일한 MIC 값인 0.125 μg/mL를 나타내었으며, *V. harveyi*, *P. piscicida*의 경우는 AM 25% + F 75%, AM 50% + F 50%에서 동일한 MIC 값이 나왔다. 위의 결과로부터 어류 유래 세균에 대한 MIC의 결과를 근거로 AM 50% + F 50%의 합제 비율이 가장 우수한 항균활성을 보였다 (Table 4).

Killing rate curve

어류유래 병원성 세균의 대표적인 균주인 *E. tarda* 및 *S. iniae*에 대한 AM과 F의 균 사멸속도 양상을 알아보았다. 항생제 단독(MIC 농도) 또는 두 항생제 복합제제(1/2 MIC + 1/2 MIC)를 시험관 내에 투여한 후 균수를 측정한 결과 Fig. 1과 같았다. AM과 F 단독 투여보다 병용 투여시 시험한 2 주의 병원성 균주에서 모두 2 Log의 감소로 상승작용을 나타내었다.

고 찰

새로운 항생물질이 개발되면 내성균의 출현빈도가 증가됨으로 동물약품 안전 사용 기준은 점차로 강화되고 [1], 그에 따른 신제품의 개발은 속도가 느려진다. 따라서 최근 동물용 항균제의 개발을 목적으로 기존의 항균제를 이용한 복합제품에 관한 연구가 많이 시도되고 있다. 어류를 포함한 산업동물에서 세균성 감염증은 단일 감염에 의한 것 보다는 두 가지의 서로 다른 특성을 가지는 세균이 복합으로 감염되므로 단일 종류의 항균제로 치료 효과를 보기는 어려운 실정이다. 20년 전부터 넙치 양식장에서 단일 세균감염증 보다는 혼합 감염증의 빈도가 높아지고 있으며, 합병증으로는 연쇄구균중과 에드와드병, 비브리오병과 에드와드병, 비브리오병과 연쇄구균증이 있다 [7]. 따라서 두가지 이상의 항균제의 병용투여는 혼합 감염증에서 항균범위를 넓히거나 세균내성의 발생을 지연시키기 위한 질병치료에 직접 사용되고 있다. 그러나 항균제를 병용하는 것이 중복감염 등의 부작용이 나타나는 경우도 있으므로 약력학적 항균 효과가 증명되는 경우에만 적용되어야 한다 [4, 8]. 일반적으로 penicillin계와 aminoglycoside계의 항생제 사이에는 부작용이 적으면서 상승효과는 높다고 알려져 있으나 두 항생제의 상호작용에 대한 병용투여 비율과 균의 사멸 속도에 대한 연구는 이루어지지 않았다 [6]. 따라서, 본 연구는 AM, F과 CRM을 사용하여 병용투여 합제에 대한 약역학적인 시험하고자 하였다.

어류 병원성세균 7종에 대하여 각 항생제의 MIC와 MBC 값을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 어류유래 병원성 세균은 *E. tarda*를 제외한 균주에서 AM은 MIC 값이 0.5 μg/mL로 낮아 항균작용이 매우 우수한 것을 알 수 있었으며, F의 MIC 값이 7종의 균주에서 1-8 μg/mL로 항균력이 우수함을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 *E. tarda*에 대하여 AM이 90-100%의 항균효력을 보인다는 허 등 [9]의 보고와 다른 결과를 보여, 병원성 균주의 감수성은 연도별 차이로 인한 것으로 사료되며 이에 따른 항생제 모니터링에 대한 연구가 지속되어야 할 것이다.

두 항균제의 병용 투여 시 상호작용을 구명하기 위하여 checkerboard method를 이용하여 FIC지수를 구하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 AM과 F의 MIC 수치가 단용 보다 병용 투여할 때 훨씬 낮게 나타나 항균활성은 증가하였고 MIC 값이 최저 2배부터 최고 8배까지 감소하였다. 살균성 + 정균성의 항생제로 통상적으로 길항작용으로 알려져 있지만 본 연구에서는 AM과 F 사이에서 상승작용 혹은 상가작용을 보였으며, 이러한 결과로 정 등 [7]은 살균성 + 정균성 병용투여인 quinolone + tetracycline, quinolone + macrolides가 상승작용 혹은 상가작용을 보인 결과와 일치하였다. 이러한 결과에서 살균성 + 정균성 병용투여가 항상 길항작용을 보이지 않고 균주의 성상에 따라 달라 질 수가 있음을 확인할 수 가 있었다 [7].

아직 보고 된 적 없는 AM과 F에 대한 병용투여 결과 *S. parauberius*, *E. tarda*를 제외한 다른 균주들에서 상가작용이 관찰되었으며, 상가작용을 나타내는 FIC 지수값이 AM과 CRM의 병용투여 결과보다 낮아 이 두 항균제에 대한 상호작용의 가전 연구가 수행되어야 할 것으로 사료되었다. 두 항균제의 병용투여시 배합비율은 항균요법에서 매우 중요한 요소로 일반적으로 알려진 sulfa제 + trimethorim = 5 : 1 제제로 판매되고 있다. 따라서 AM과 F의 최적배합비율을 찾기 위하여 어류 병원성 세균 4 종에 대하여 시험하였다. 김 등 [3]에 의하면 enrofloxacin + colistin = 1 + 4 혹은 4 + 1에서 강한 항균활성이 나타났으나 다른 배합비율에서는 단독투여의 경우보다 항균활성이 떨어졌다고 보고하였다. 본 연구에서는 어류 유래 세균에 대한 합제 비율은 AM + F = 1 : 1의 비율이 최적의 배합비율로 나타났다. 이러한 병용투여의 비율로 실시간으로 균의 살균 속도를 확인하기 위하여 어류 유래 병원성세균의 대표적인 균주인 *E.tarda* 및 *S. iniae*에 대하여 균 사멸 속도를 측정하였다. AM과 F의 단독투여보다 병용투여 시 2개의 병원성 균주에서 2 Log의 감소로 상승작용을 보여주었다.

따라서 본 연구결과를 요약하면 어류병원성 세균을 대상으로 현재 사용 중인 항균제를 중심으로 새로운 조합의 항균요법제 개발을 위하여 약력학적인 관점에서 MIC, FIC, formulation ratio와 killing rate curve를 기초로 최적의 병용 투여는 AM + F의 합제임을 확인할 수 있었으며, 1 : 1의 배합비율에서 가장 좋은 항균활성이 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 산업적인 관점에서 어류 분야에서 새로운 항생요법으로 응용이 가능할 것으로 생각되었다.

결 론

본 연구에서는 어류 유래 병원성 세균에서 AM과 F를 중심으로 다양한 항생제의 병용 투여 시 나타나는 상호 작용을 알아보기 위하여 최소억제농도, 최소사멸농도, 분획별 억제농도 및 균의 사멸속도 등의 항균활성에 대하여 조사하였다. AM과 기타 항생제와의 상호작용을 알아보기 위하여 checkerboard method를 사용하여 FIC 값을 구한 결과 특히 AM과 F의 병용에서 *S. parauberius*와 *E. tarda*에서 각각 0.56, 0.625으로 상가 작용을 하였고, 나머지 5 균주에서는 강한 상승작용을 하였다. AM과 F 배합비율에 따른 어류 유래 세균에 대한 MIC결과 AM 50%+F 50%의 합제비율이 가장 우수한 항균활성을 보였다. 어류 유래 병원성세균의 대표적인 균주인 *E. tarda* 및 *S. iniae*에 대한 균 사멸 속도를 실시간으로 측정한 결과 AM과 F 단독투여보다 병용 투여 시 2개의 병원성 균주에서 모두 상승 작용을 나타내었다. 이러한 결과는 산업적인 관점에서 어류 분야에서 새로운 항생요법으로 응용이 가능할 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원과 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의한 것입니다.

참고문헌

1. **국립수의과학검역원.** 동물용의약품의 안전사용기준. 국립수의과학검원고시 제2007-25호. 국립수의과학검역원, 안양, 2008.
2. **국주희, 송영미, 배민석, 고명진, 유명상, 안은숙, 박은희, 조명식, 강길진.** 식육중 항생제 florfenicol의 분석. 한국식품위생안전성학회지 2008, **23**, 319-323.
3. **김민규, 윤효인, 박승춘.** 병원성미생물에 대한 Enrofloxacin과 Colistin의 배합비율에 따른 항균작용과 균의 사멸속도. 한국임상수의학회지 1997, **14**, 215-222.
4. **김홍태, 정경태, 이동수, 이근우.** 유통되는 쇠고기에서 분리한 대장균의 항생제 내성 조사 · 연구 (2). 한국가축위생학회지 2009, **32**, 93-102.
5. **손성완, 이광직, 이명헌, 장환, 정갑수, 위성환, 이주호, 강문일.** 국내 동물용 의약품의 사용과 품질관리 현황. 한국수의공중보건학회지 2006, **30**, 89-96.
6. **오종석, 안태휴.** 녹농균에 대한 Aminoglycoside계와 Cephalosporin계의 병합작용. 대한미생물학회지 1986, **21**, 375-380.
7. **정승희, 김진우.** 병용 항균제의 어류질병 세균에 대한 시험관내 항균활성. 한국어병학회지 2000, **13**, 45-51.
8. **정현도, 전세규.** 항생제 사용과 세균성 어류질병의 치료. 한국어병학회지 1992, **5**, 37-48.
9. **허정호, 정명호, 조명희, 김국헌, 이국천, 김재훈, 정태성.** 경남 남부지역 양식어류 질병에서 항생제 감수성에 관한 연구. 대한임상수의학회지 2002, **19**, 19-22.
10. **Andrews JM, Boswell FJ, Wise R.** Evaluation of the Oxoid Aura image system for measuring zones of inhibition with the disc diffusion technique. J Antimicrob Chemother 2000, **46**, 535-540.
11. **Bonapace CR, Friedrich LV, Bosso JA, White RL.** Determination of antibiotic effect in an *in vitro* pharmacodynamic model: comparison with an established animal model of infection. Antimicrob Agents Chemother 2002, **46**, 3574-3579.
12. **Bouanchaud DH.** *In-vitro* and *in-vivo* synergic activity and fractional inhibitory concentration (FIC) of the components of a semisynthetic streptogramin, RP 59500. J Antimicrob Chemother 1992, **30**, 95-99.
13. **Honeybourne D, Andrews JM, Cunningham B, Jevons G, Wise R.** The concentrations of clinafloxacin in alveolar macrophages, epithelial lining fluid, bronchial mucosa and serum after administration of single 200 mg oral doses to patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. J Antimicrob Chemother 1999, **43**, 153-155.
14. **Odland BA, Erwin ME, Jones RN.** Quality control guidelines for disk diffusion and broth microdilution antimicrobial susceptibility tests with seven drugs for veterinary applications. J Clin Microbiol 2000, **38**, 453-455.
15. **Park BK, Lim JH, Kim MS, Hwang YH, Yun HI.** Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. Res Vet Sci 2008, **84**, 85-89.