

Bazı Aminoglikozit Antibiyotiklerle In Vivo Araştırmalar

Emir TAN (*)

Candan Bozok Johansson (*)

Özet : Gentamisin, tobramisin, sisomisin ve amikasinin tavşanlarda i.m. uygulamadan sonra serum düzeyleri araştırılmıştır. Dört antibiyotiğin de birinci saat içinde (özellikle 20. ve 40. dakikalarda) serum düzeylerinin en üst seviyede olduğu saptanmıştır. Adı geçen antibiyotiklerin antimikrobiyal in vivo aktiviteleri beyaz Balb/c cinsi farelerde denenmiştir (Mice protection test). Gentamisin, tobramisin, sisomisin ve amikasine biri duyarlı, diğeri dirençli olan iki *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile hayvanlar enfekte edildikten sonra aynı antibiyotiklerle tedavi edilmişlerdir. Sonuçlarımızda duyarlı *P. aeruginosa* suşu karşısında tobramisinin, dirençli *P. aeruginosa* suşu karşısında ise amikasinin en etkili antibiyotikler olduğu görülmüştür.

IN—VIVO—UNTERSUCHUNGEN MIT EINIGEN AMINOGLYKOSID—ANTIBIOTIKA

Zusammenfassung : Die Serumspiegel bei den Kaninchen wurden nach der i.m. Verabreichung von Gentamicin, Tobramycin, Sisomicin und Amikacin bestimmt. Es wurde festgestellt, dass alle vier Antibiotika ihre höchsten Serumspiegel innerhalb von einer Stunde (20 bzw. 40 min.) erreichen. Ausserdem wurde die antimikrobielle in-vivo-Aktivitaet der oben genannten Antibiotika an weissen Balb/c Mäusen geprüft (Mice Protection Test). Die Tiere wurden mit zwei Staemmen von *Pseudomonas aeruginosa* infiziert, von denen eine gegen diese

(*) İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Mikrobiyoloji Birimi

Antibiotika rezistant, die andere hingegen empfindlich war. Anschliessend wurden die Tiere mit Gentamicin, Tobramycin, Sisomicin und Amikacin behandelt. Die Ergebnisse zeigen, dass Tobramycin gegen den empfindlichen *P. aeruginosa*-Stamm und Amikacin gegen den resistenten *P. aeruginosa*-Stamm, die wirksamsten Aminoglykosid-Antibiotika sind.

Schlüsselwörter : Aminoglykosid-Antibiotika, Gentamicin, Tobramycin, Sisomicin, Amikacin, Serumspiegel, PD₅₀ Werta.

GİRİŞ

1963 yılında aminoglikozit yapısındaki gentamisin'in Weinstein ve arkadaşları (1) tarafından izole edilmesinden sonra bu grup antibiyotikler için yeni bir çıkış açılmış ve bir çok araştırma grubunun yoğun çalışmaları sonucu yeni aminoglikozit antibiyotikler, tobramisin, amikasin, sisomisin ve netilmisin özellikle Gram negatif çomak bakteriler karşısındaki üstün etkileri ile tedavide yerlerini almışlardır. Kimyasal yapı ve etki yolları birbirlerine çok benzeyen bu antibiyotikler özellikle *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel etkileri ve çeşitli bakterilerde aminoglikozit grubu antibiyotiklere karşı direnç durumları ile değerlendirilmektedirler.

Bu çalışmamızda aminoglikozit antibiyotiklerden gentamisin, tobramisin, sisomisin ve amikasinin in vitro deneylerle antibakteriyel etkilerinin çeşitli bakteri suşları karşısında saptanması çalışmalarının devamı olarak in vivo deney-

lerle tavşanlarda toksik olmayan dozla elde edilen serum düzeylerinin ve farelerde oluşturulan deneysel enfeksiyonların tedavisinde koruyucu dozlarının belirlenmesi ve sonuçların in vitro deneylerle bağlantılı olup olmadığı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Gereç

Tavşanlarda serum düzeylerinin saptanması çalışmalarında her antibiyotik için altı adet erkek albino tavşan kullanılmıştır. Antibiyotiklerin koruyucu dozlarının fareler üzerindeki (PD₅₀ değerlerinin) tayininde ise ağırlıkları 20-30 g (\bar{x} = 25 g) arasında değişen toplam 272 Balb/c cinsi albino fındık faresi kullanılmıştır.

Tavşanlarda serum düzeylerinin saptanması çalışmalarında tobramisin, amikasin ve sisomisin için *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ve gentamisin için *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) suşları kullanılmıştır. Koruyucu doz çalışmalarında ise in vitro di-

lisyon ve difüzyon yöntemleri sonucu dört antibiyotiğe de, biri duyarlı (No : 119), diğeri ise dirençli (No : 7722) olarak saptadığımız iki *Pseudomonas aeruginosa* suşu kullanılmıştır.

Deneylerde besiyeri olarak antibiyotik medium 1 (pH : 7) kullanılmıştır. Bakterilerin stok süspansiyonları için ise antibiyotik medium 11 (pH : 8) kullanılmıştır.

Çalışmalarımızda kullanılan antibiyotiklerden tobramisin sülfat (aktivitesi 904 mcg/mg) Eli Lilly firmasından, amikasin baz (aktivitesi 915 mcg/mg) Bristol Myers firmasından, gentamisin sülfat (aktivitesi 615 mcg/mg) ANSA İlaç fabrikasından, sisomisin sülfat (aktivitesi 554 mcg/mg) Birleşik Alman İlaç fabrikaları kanalı ile Schering firmasından sağlanmıştır. Antibiyotik stok çözeltileri gentamisin, sisomisin ve amikasin için pH : 8 fosfat tamponu; tobramisin için steril damıtık su ile uygun konsantrasyonlarda hazırlanmış ve + 4°C de muhafaza edilmiştir.

Yöntemler

I — Tavşanlarda serum düzeylerinin saptanması :

a) Stok bakteri süspansiyonları USP XX (1980)'ye göre hazırlanmıştır.

b) Standart eğrilerin çizilmesi ve tavşanlarda çeşitli zaman aralıklarında serum düzeylerinin araş-

tırılması : Antibiyotikler uygulanmadan önce deneye alınacak olan tavşanlardan elde edilen birleştirilmiş (pooled) serum ile sisomisin, tobramisin ve gentamisin için 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml ve 6 µg/ml'lik konsantrasyonlar; amikasin için 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve 20 µg/ml'lik konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Referans nokta olarak sisomisin, tobramisin ve gentamisin için 4 µg/ml; amikasin için 10 µg/ml'lik konsantrasyonlar alınmıştır. Bu konsantrasyonlar bakteri süspansiyonu karıştırılmış besiyeri içeren Petri kutularına uygulanmış ve 37°C de 18 saat inkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonlarının çapları saatli kompas ile ölçülmüştür. Bu değerlerin ve konsantrasyonların logaritmaları alınarak FDA (1978) da verilen $y = ax + b$ formülünde a ve b değerleri bulunmuştur. Ayrıca her antibiyotik için standart eğriler çizilmiştir (2).

Tavşanların tartıları alınarak gentamisin, tobramisin ve sisomisini 1 mg/kg; amikasini 7.5 mg/kg miktarlarda içeren ampuller hazırlanmıştır. Deney başlangıcında tavşanlardan kontrol olarak kan alınmış ve daha sonra antibiyotikler i.m. yolla şırınga edilmiştir. Antibiyotiklerin verilmesinden 20, 40, 60, 120 ve 240 dakika sonra kan alınıp serumları ayrılarak 50 µl'lik mikropipetle serumlar, bakteri süspansiyonu ile karıştırılmış besiyeri içeren Petri kutularındaki oyuklara tatbik

edilmiştir. Her Petri kutusuna referans nokta konsantrasyonları da konmuştur. 37°C de 18 saatlik inkübasyondan sonra oluşan zonlar saatli kompasla ölçülmüş ve ortalamaları alınmıştır. Her zaman aralığı için dört Petri kutusu kullanılmıştır. Her zaman aralığı için bulunan ortalama zon değerinin logaritması alınarak $y = ax + b$ formülüne uygulanmıştır. Bu formülde a ve b değerleri standart eğri için daha önce bulunduğundan x yerine de okunan zonun logaritması konarak bilinmeyen serum düzeyi $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar standart eğrilerden de okunarak kontrol edilmiştir.

II — Fareler üzerinde antibiyotiklerin koruyucu dozlarının (PD_{50} değerlerinin) hesaplanması :

Duyarlı suş için dört antibiyotikğin 0.5 mg/kg, 2.5 mg/kg, 25 mg/kg ve 50 mg/kg'lık dozları; dirençli suş için ise dört antibiyotikğin 5 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg'lık dozları seçilmiştir. Bu dozların seçiminde antibiyotiklerin MIC'ları göz önüne alınmıştır. Her antibiyotik ve her konsantrasyon için 8 fındık faresi içeren gruplar kullanılmıştır. Her iki suşun 18 saatlik kültürleri 10^7 bakteri/ml olacak şekilde sulandırılmış ve fındık farelerine periton içi yoldan 0.5 ml verilmiştir. Bakteri süspansiyonu şırınga edildikten bir saat ve üç saat sonra her antibiyotikğin yukarıda belirtilen konsantrasyon-

ları sekizli gruplara deri altı yolla verilmiştir. Ayrıca 8 fındık faresi içeren kontrol grubuna da sadece bakteri süspansiyonu şırınga edilmiştir.

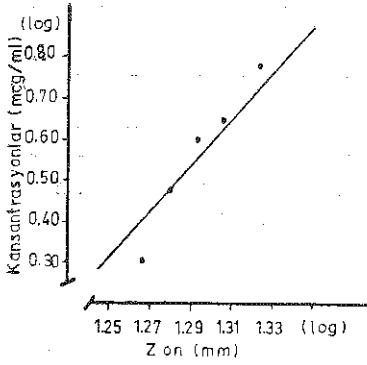
Hayvanlar deneye alındığı saatten itibaren 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca gözlenmiş ve canlı kalan hayvanların sayısı kaydedilmiştir. Deney sonuçları Litchfield ve Wicoxon'un yöntemine göre hesaplanmıştır (3, 4, 5, 6).

BULGULAR

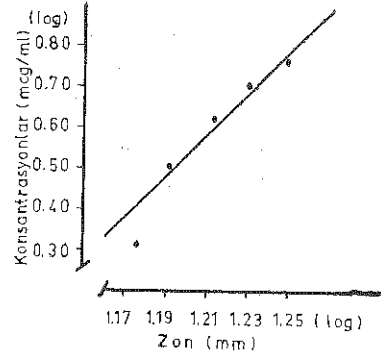
Agarda difüzyon yöntemi kullanılarak her antibiyotik için çizilen ve serum konsantrasyonlarının hesaplandığı eğrilere ilişkin konsantrasyonlar ve FDA'nın (1978) verdiği yöntemlere göre düzeltilmiş inhibisyon zon ortalama çap değerleri Tablo 1'de ve standart eğrileri Şekil 1, 2, 3 ve 4 de verilmiştir.

Antibiyotiklerin i.m. verilislerinden sonra belli aralıklarla kanları alınmış ve serum düzeylerindeki antibiyotik konsantrasyonları standart eğrilerine ait doğru denklemleri ile $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Bulunan ortalama değerler Tablo 2'de verilmiştir.

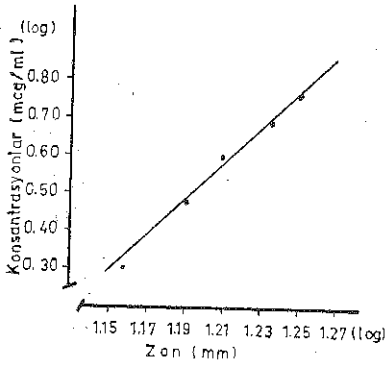
Serum düzeyi araştırmamızda gentamisin, tobramisin ve sisomisin 1 mg/kg dozda i.m. yolla tavşanlara uygulandığında serum düzeylerinin gentamisinde 20 ve 40 dakikalarda; tobramisinde 40 dakikada; sisomisinde 20 dakikada en



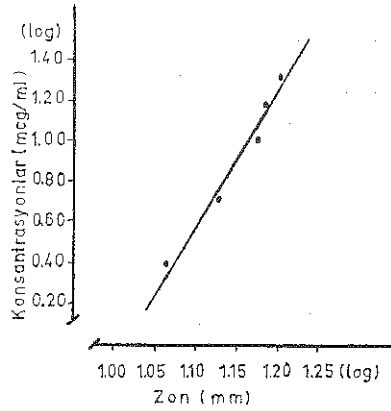
Şekil 1 : Gentamisin'in standart eğrisi ($r = 0.985$ $a = 3,516$ $b = -3,986$).



Şekil 2 : Sisomisin'in standart eğrisi ($r = 0.998$ $a = 5,14$ $b = -5,658$).



Şekil 3 : Tobramisin'in standart eğrisi ($r = 0,993$ $a = 4,753$ $b = -5,17$).



Şekil 4 : Amikasin'in standart eğrisi ($r = 0,945$ $a = 6,736$ $b = -6,883$).

üst düzeyde olduğu saptanmıştır. Amikasin 7.5 mg/kg dozda i.m. yolla tavşanlara uygulandığında ise ortalama serum düzeyinin 40 dakika en üst düzeye ulaştığı bulunmuştur.

Denediğimiz dört antibiyotiğe

de duyarlı (No : 119) ve dirençli (No : 7722) *P. aeruginosa* suşları ile farelerde oluşturulan deneysel enfeksiyonlarda Litchfield ve Wixon'un yöntemine göre saptanan antibiyotiklerin koruyucu dozlarının (PD_{50}) karşılaştırılması Tablo 3'de görülmektedir.

Tablo 1 : Agarda difüzyon yöntemiyle çizilen standart eğrilere ait sayısal değerler

İnhibisyon ortalama zon çapları (mm)					
Konsan- trasyon (mcg/cm ³)	Genta- misin	Tobra- misin	Siso- misin	Konsan- trasyon (mcg/cm ³)	Ami- kasin
2	18.6	14.4	15.0	2.5	11.7
3	19.1	15.5	15.6	5	13.7
4	19.6	16.2	16.4	10	15.0
5	20.7	17.2	16.9	15	15.4
6	21.0	17.7	17.7	20	16.6

Tablo 2 : Kas içi yolla uygulanan dört antibiyotığın çeşitli zaman aralıklarında serumdaki konsantrasyonları

Serum düzeyi Konsantrasyonu (mcg/cm ³)				
Zaman (dakika)	Gentamisin ¹ (1mg/kg)	Tobramisin (1mg/kg)	Sisomisin (1mg/kg)	Amikasin (7.5mg/kg)
20	1.51 ²	1.36	1.55	18.99
40	1.52	1.67	1.48	31.05
60	1.42	1.59	1.30	30.9
120	0.91	1.23	0.89	15.45
240	0.26	0.29	0.17	3.09

¹ Tavşanlara kg başına verilen doz.

² 6 tavşanda elde edilen değerlerin ortalaması (mcg/cm³)

Duyarlı *P. aeruginosa* (No : 119) suşu ile fındık farelerinde oluşan deneysel enfeksiyona karşı tobramisin'in 15 mg/kg'lık koruyucu doz ile en etkili antibiyotik olduğu görülmüştür. Tobramisini 22 mg/kg'lık dozla sisomisin ve aynı dozla gentamisin izlemektedir. Amikasin ise 51 mg/kg'lık koruyucu dozla

üç antibiyotığın arkasından gelmektedir. Dirençli *P. aeruginosa* (No : 7722) suşu karşısında 48 mg/kg'lık koruyucu dozla en etkili antibiyotik olarak amikasin görülmektedir, onu 88 mg/kg ile gentamisin, 98 mg/kg ile tobramisin ve 230 mg/kg ile de sisomisin izlemektedir.

Tablo 3 : Biri duyarlı, diğeri dirençli iki *P. aeruginosa* suşu ile farelerde oluşturulan deneysel infeksiyonlarda dört antibiyotikte saptanan koruyucu dozlar (PD₅₀)

Antibiyotik	MIC (mcg/cm ²)	<i>P. aeruginosa</i> (No : 119) Koruyucu dozlar (PD ₅₀) mg/kg
Gentamisin	0.9	22 (10.11 — 47.89)*
Tobramisin	0.48	15 (6.16 — 36.56)
Sisomisin	0.24	22 (10.44 — 46.35)
Amikasin	1.9	51 (24.31 — 106.99)

Antibiyotik	MIC (mcg/cm ²)	<i>P. aeruginosa</i> (No : 7722) Koruyucu dozlar (PD ₅₀) mg/kg
Gentamisin	62.5	88 (51.77 — 149.6)
Tobramisin	15.6	98 (57.31 — 167.6)
Sisomisin	15.6	230 (28.03 — 1887.38)
Amikasin	15.6	48 (21.92 — 105.12)

* Parantez içindeki sayılar güvenilirlik sınırlarını göstermektedir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Denediğimiz bu dört antibiyotığın serum düzeylerinin ilk 60 dakika içinde (özellikle 20. ve 40. dakikalarda) en üst seviyede olması diğer araştırmacıların değişik dozlarına ve uygulama şekillerine karşın benzerlik göstermektedir (7-15). Ayrıca in vivo deney sonuçlarımız in vitro dilüsyon yöntemi ile karşılaştırılacak olursa, in vitro dilüsyon yöntemi için diğer araştırmacılarca verilen gentamisin, tobramisin ve sisomisin için 1 µg/ml ve amikasin için 20 µg/ml duyarlık sınırının toksik olmayan dozla elde edilebildiği görülmüştür (9, 16).

In vivo koruyucu doz araştırması bulgularımız sonucunda duyarlı *P. aeruginosa* suşu karşısında tobramisin, dirençli *P. aeruginosa* suşu karşısında ise amikasinin en etkili antibiyotikler olduğu saptanmıştır. Sonuçlarımızda dikkati çeken en önemli noktalardan biri amikasinin in vivo koruyucu doz araştırmamızda hem duyarlı hem de dirençli *P. aeruginosa* suşları üzerinde hemen hemen aynı derecede etki göstermesidir. In vitro deneylerde amikasin dirençli olarak saptadığımız *P. aeruginosa* suşuna in vivo deneylerde en etkili antibiyotik olarak amikasin sap-

tanmıştır. Amikasinin diğer aminoglikozitleri inaktive eden enzimlere karşı dayanıklı olmasının deney sonuçlarımızda bir rol oynayıp oynamadığı düşünülmüş ve bu konunun derinleştirilerek araştırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Miller ve arkadaşlarının (17) çalışması bu kanımızı kuvvetlendirmektedir. Bu araştırmacılar AAC (6)-II enzimi taşıyan yüksek virulanslı *Pseudomonas* suşlarının amikaside duyarlı olduklarını saptamalarına karşın, bu suşlarla PD₅₀ değerlerinin çok yüksek olduğunu; Aksine, APH (3')-IV direnç modeline sahip stafilokoklarda elde edilen PD₅₀ değeri çok yüksek olmamakla beraber, gentamisin, tobramisin ve netilmisinle elde edilen çok düşük PD₅₀ değerlerinin ışığında bu suşun amikaside dirençli olarak düşünülebileceğini bildirmişlerdir.

Waitz ve arkadaşları (15, 18) yaptıkları iki ayrı çalışmada *P. aeruginosa* suşları karşısında sisomisinin koruyucu dozunun gentamisin, tobramisin, amikasin ve kanamisininden üstün olduğunu bildirmişlerdir. Price ve arkadaşları (11) ise *P. aeruginosa* suşu ile farelerde deneysel enfeksiyon tedavisinde en etkili antibiyotikğin amikasin olduğunu, amikasini gentamisin ve kanamisinin izlediğini bildirmişlerdir. Kawaguchi ve arkadaşları (19) amikasinin kanamisinden, Weinstein ve arkadaşları (1) gentamisinin neomisin ve kanamisinden, Scheer (5) ise sisomisinin gentamisininden üstün olduğunu sap-

tamışlardır. Shadomy ve arkadaşları (6) koruyucu doz çalışmalarında sırasıyla sisomisin, tobramisin ve gentamisinin en etkili koruyucu doza sahip olduklarını bildirmişlerdir. Davis (20) de tobramisinin gentamisinden daha etkili olduğunu bildirmiştir. Waitz (21) koruyucu doz çalışmalarında bakterinin şırıngasından sonra antibiyotiklerin verilmesiyle tedavide daha iyi sonuçlar elde edileceğini ve bir bakteri cinsinin bir suşuna karşı alınan sonuçların aynı cinsten diğer suşlar için geçerliliğinin zayıf bir olasılık olduğuna dikkati çekmiştir.

Çalışmamızda, bir çok Gram negatif bakterinin etken olduğu çeşitli enfeksiyonların tedavisinde önemli bir yere sahip olan aminoglikozitlerden gentamisin, tobramisin, sisomisin ve amikasinin tavşanlarda serum düzeyleri saptandığında, gentamisin, tobramisin ve sisomisin için in vitro difüzyon yönteminde kabul edilen 1 µg/ml ve amikasin için 20 µg/ml'lik duyarlılık sınırlarının toksik olmayan dozlarla elde edilebildiği görülmüştür (9, 16). Farelerde yapılan koruyucu doz çalışmamızda duyarlı *P. aeruginosa* suşu karşısında tobramisinin, dirençli *P. aeruginosa* suşu karşısında ise amikasinin en etkili antibiyotikler olduğu gözlenmiş, dirençli *P. aeruginosa* suşu karşısındaki amikasinin oldukça etkili olarak saptanan PD₅₀ değeri istisna edilirse in vivo deney sonuçları ile in vitro deney sonuçları

arasında benzerlik olduğu saptanmıştır. Dirençli *P.aeruginosa* suşu karşısındaki amikasinin etkisinde görüldüğü gibi aminoglikozitleri inaktive eden enzimlerin oynadıkları rolün önemi bir kez daha gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Weinstein M.J., Luedemann G. M., Oden E.M., Wagman G.H., «Gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic complex» **Antimicrob Agents Chemother** p 1 (1963).
2. Grave D.C., Rondall W.A., «Assay methods of antibiotics» a laboratory manual, **Medical Encyclopedia Inc.** New York (1955).
3. Litchfield J.T., Wicoxon F., «A simplified method of evaluating dose-effect experiments» **J Pharmacol Ex Therap** 99 : 99-113 (1949).
4. Meyers B.R., Hirschmann S.Z., «Comparison of activity of sisomicin and gentamicin in mouse protection tests with Gram-negative bacilli» **Antimicrob Agents Chemother** 10 : 384-386 (1976).
5. Scheer M., «Wirkungsvergleich von Sisomicin und Gentamicin im Tierexperiment» **Infection** 4 : 366-369 (1976) Suppl. 4.
6. Shadomy S., Utz C., Shadomy H.J., «In vivo studies with sisomicin, gentamicin and tobramycin» **Infection** 4 : 362-365 (1976) Suppl. 4.
7. Blair D.C., Fekety F.R., Bruce B., Silva J., Archer G., «Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections with tobramycin» **Antimicrob Agents Chemother** 8 : 22-29 (1975).
8. Daniels P.J.L., «Antibiotics (Aminoglycosides)» Editor : K. Othmer **Encyclopedia of Chemical Technology**, Third Edition, John Wiley and Sons. Inc. 2 : 819-852 (1978).
9. Knothe H., «Die antimikrobielle Aktivität von Gentamicin, Sisomicin und Tobramycin» **Infection** 4 : 294-299 (1976) Suppl. 4.
10. Lode H., Kemmerich B., Koeppe P., «Comparative clinical pharmacology of gentamicin, sisomicin and tobramycin» **Antimicrob Agents Chemother** 8 : 396-401 (1975).
11. Price K.E., Chisholm D.R., Misiek M., Leitner F., Tsai Y.H., «Microbiological evaluation of BB-K8, a new semisynthetic aminoglycoside» **J Antibiot** 25 : 709-731 (1972).
12. Riff L.J., Moreschi G., «Netilmicin and gentamicin : Comparative pharmacology in humans» **Antimicrob Agents Chemother** 11 : 609-614 (1977).
13. Scheer M., «Zur Kinetik von Sisomicin bei kleinen Versuchstieren» **Infection** 4 : 355-361 (1976) Suppl. 4.
14. Schoutens E., Vanderlinden M.P., Yourossowsky E. «Tobramycin : Clinical and micro-

- biological evaluation» *Int J Clin Pharmacol* 8 : 207-215 (1973).
15. Waitz J.A., Moss E.L., Oden E.M., Weinstein M.J., «Biological studies with antibiotic 6640, a new broadspectrum aminoglycoside antibiotic» *J. Antibiot* 23 : 559-565 (1970).
 16. Schassan H.H., «In vitro activity of new aminoglycoside antibiotics alone and with Beta-lactam antibiotics» *Infection* 7 : 248-252 (1979).
 17. Miller G.H., Hare R.S., Moss E.L., Sabatelli F.J., Schaffer T.W., Waitz J.A., «Evaluation of netilmicin susceptibility discs using bacteria with known aminoglycoside resistance Patterns : Correlation of in vitro and in vivo test results» *Scand J Infect Dis Suppl* 23 : 62-73 (1980).
 18. Waitz J.A., Moss E.L., Drube C.G., Weinstein M.J., «Comparative activity of sisomicin, gentamicin, kanamycin and tobramycin» *Antimicrob Agents Chemother* 2 : 431-437 (1972).
 19. Kawaguchi H., Naito T., Nakagawa S., Fujisawa K.I., «BB-K8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic» *J Antibiot* 25 : 695-707 (1972).
 20. Davis S.D. «Activity of gentamicin, tobramycin, polymyxin B, and colistimethate in mouse protection tests with *Pseudomonas aeruginosa*» *Antimicrob Agents Chemother* 8 : 50-53 (1975).
 21. Waitz J.A., «Laboratory evaluation of aminoglycoside antibiotics» *Development in Industrial Microbiology* 16 : 161-174 (1975).