

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۲ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۷، صفحات ۴۸-۴۳

مقایسه اثر ضد میکروبی آمیکاسین به فرم آزاد و لیپوزومی بر *پسودوموناس آئروژینوزا*

محسن میرزایی^۱، امیر قریب^۱، پرویز اولیاء^{۲*}

^۱ گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

^۲ گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

نویسنده رابط: پرویز اولیاء، تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدا... زاده، پلاک ۲۹، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی.

تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲ powlia@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۸/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۸

چکیده:

زمینه و اهداف: *پسودوموناس آئروژینوزا* از عوامل مهم بیماریزای فرصت طلب است که با داشتن فاکتورهای بیماریزایی متعدد قادر است طیف وسیعی از عفونت ها را ایجاد کند. سیستم های حامل دارویی موجب کاهش سمیت داروها شده و شاخص های درمانی را به صورت قابل ملاحظه ای افزایش می دهند. استفاده از لیپوزوم ها برای این منظور بسیار مفید است. لیپوزوم ها گویچه های کلوئیدی هستند که قطر آنها از کمتر از چند نانومتر تا چندین میکرومتر متغیر است. هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین در مقایسه با فرم آزاد دارو بر سویه *پسودوموناس آئروژینوزا* بود.

روش بررسی: در این مطالعه، برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) آمیکاسین در فرم لیپوزومی و آزاد بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، از روش رقت در برات مطابق دستورالعمل (CLSI) Clinical and laboratory standards institute استفاده شد. برای تهیه لیپوزوم ها از روش سونیکاسیون استفاده شد. تغییرات تعداد باکتری ها در حضور غلظت معادل MIC آمیکاسین در فرم لیپوزومی در مقایسه با فرم آزاد مورد بررسی قرار گرفت و با تغییرات تعداد باکتری ها در حضور غلظت های مختلف آمیکاسین در فرم آزاد، مقایسه شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که آمیکاسین در فرم لیپوزومی بر *پسودوموناس آئروژینوزا* اثر ضد میکروبی دارد و مقدار MIC آن معادل ۴ $\mu\text{g/ml}$ و مقدار MIC در فرم آزاد ۲ $\mu\text{g/ml}$ بدست آمد. مقایسه تغییرات کاهش تعداد باکتری ها در حضور آمیکاسین در فرم لیپوزومی با آمیکاسین در فرم آزاد نشان داد که بعد از گذشت ۸ ساعت آمیکاسین در فرم لیپوزومی با غلظت ۴ $\mu\text{g/ml}$ دارای اثری برابر در مواجهه با غلظت ۶ $\mu\text{g/ml}$ آمیکاسین به فرم آزاد بعد از گذشت ۴ ساعت است.

نتیجه گیری: باتوجه به مقاومت بالای *پسودوموناس آئروژینوزا* به آنتی بیوتیک های متداول، احتمال دارد که با مطالعات بیشتر بتوان از سیستم های حامل دارویی، از جمله لیپوزوم های حاوی آمیکاسین به عنوان دارو استفاده کرد.

کلید واژها: *پسودوموناس آئروژینوزا*، لیپوزوم، آمیکاسین

مقدمه :

سدیم هیدروکسید، ۲- پروپانول، اسید بوریک، ۲- مرکاپتو اتانل، متیل کلراید، کلروفرم، اتانل و اورتوفتال دی آلدئید از شرکت مرک- آلمان تهیه شدند. محلول آنتی بیوتیکی در آب مقطر استریل تهیه می شد و به صورت تازه در روز مورد استفاده، تهیه می گردید .

روش تهیه لیپوزوم ها :

برای تهیه لیپوزوم های حاوی آمیکاسین مقادیر مشخصی از لسیتین و کلسترول به یک بالن ته گرد منتقل شد و توسط کلرفرم به صورت کامل حل می شد. سپس به دستگاه روتار متصل شد و با استفاده از دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و تحت فشار کم طی مدت کوتاهی کلرفرم حذف می گردید و لایه نازکی از چربی بر دیواره داخلی بالن ایجاد می شد. به منظور هیدراته کردن فیلم حاصله و تشکیل لیپوزوم ها، مقدار ۶۰ میلی گرم پودر آمیکاسین در ۶ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به آرامی به فیلم حاصل افزوده شد. سپس مجدداً بالن به دستگاه روتار متصل شد و در دمای اتاق بدون خلاء هیدراته شدن فیلم صورت گرفت. برای جدا سازی داروی محصور نشده از سوسپانسیون لیپوزومی از روش سانتریفوژ استفاده شد. برای این منظور سوسپانسیون لیپوزومی ۳ بار و هر بار ۴۵ دقیقه با سرعت 60000g سانتریفوژ و بعد از هر بار سانتریفوژ مایع رویی جدا شده و رسوب لیپوزومی دوباره با آب مقطر به حالت سوسپانسیون در می آمد. رسوب نهایی با استفاده از ۶ میلی لیتر آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد و به منظور تعیین درصد محصور سازی و روند آزاد سازی مورد بررسی قرار گرفت (۷).

تعیین درصد محصور سازی :

برای این منظور پس از جداسازی داروی محصور نشده مقدار ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون لیپوزومی به یک مزور انتقال یافت. برای شکستن غشاء لیپوزومی و آزاد سازی آمیکاسین محصور شده مقدار ۴ میلی لیتر تریتون X-100 (۱۰٪) V/V داخل مزور ریخته شد و بعد با تکان دادن شدید و قرار دادن آن در حمام آب گرم ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد، انحلال غشاء لیپوزومی صورت پذیرفت. حجم محلول حاصل با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد، سپس بعد از انجام مراحل مشتق سازی، میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول فوق به دستگاه HPLC تزریق شد و در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد آمیکاسین و تعیین غلظت آن، کارایی محصور سازی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (۸).

پسودوموناس آئروژینوزا یک باکتری بیماریزای مهم است که به خصوص با عفونت هایی از قبیل پنومونی، عفونت دستگاه ادراری و عفونت زخم سوختگی در ارتباط می باشد. این باکتری دارای مکانیسم های متفاوت مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها از قبیل غیر فعال سازی آنزیماتیک دارو، تغییر در جایگاه هدف دارو و سیستم های برون ریز (efflux) آنتی بیوتیک ها است (۱و۲). با این حال نفوذ پذیری کم غشاء خارجی این باکتری مهم ترین عامل در ایجاد مقاومت دارویی محسوب می شود (۳). پسودوموناس آئروژینوزا به صورت ذاتی نسبت به بسیاری از عوامل ضد میکروبی دارای مقاومت می باشد و ایجاد سویه های مقاوم و اغلب بروز مقاومت های چندگانه دارویی (Multidrug resistance) سبب شده است که درمان عفونت های ناشی از این باکتری در بیشتر موارد، با شکست مواجه شود (۳). یکی از روش های جدید دارو درمانی استفاده از دارو رسانی (Drug delivery) با استفاده از لیپوزوم ها می باشد. حاملین دارو می توانند دارو را در خود محصور نموده و از این طریق از سمیت آن درون بدن کاسته می شود. همچنین حاملین دارویی باعث می شوند که نیمه عمر دارو در بدن بیشتر شود (Long - circulation) و از این طریق موجب می شوند که به منظور درمان بیماری دوز کلی کمتری از دارو نیاز باشد. این امر نیز به کاهش اثر جانبی دارو و اثرات تخریبی آن روی بافت های مختلف منجر می شود (۴و۵). هدف از انجام این مطالعه، مقایسه آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین در مقایسه با آمیکاسین در فرم آزاد بر پسودوموناس آئروژینوزا بود .

مواد و روش ها :

در این مطالعه از کشت ۲۴ ساعته سویه استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا (ATCC27853) استفاده شد. برای این منظور از کشت باکتری بر روی محیط مولر - هیتون آگار، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند در نرمال سالین ۰/۸۵ درصد تهیه شد. در این شرایط تعداد باکتری ها حدود $10^8 \times 5/1$ CFU/ml می باشد. از این سوسپانسیون در مراحل بعدی آزمایش ها استفاده می شد (۶). پودر آنتی بیوتیک آمیکاسین با پتنتی معادل ۰/۹۰۷ میلی گرم و تریتون X-100 از شرکت سیگما؛ لسیتین و کلسترول از شرکت Lipoid آلمان تهیه شدند. متانل، کربنات سدیم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات،

تعیین MIC به جای آمیکاسین آزاد، از فرم لیپوزومی آن استفاده شد (۹).

بررسی اثر لیپوزوم های حاوی دارو بر رشد پseudomonas آئروژینوزا:

فعالیت باکتریسیدال آمیکاسین در غلظت های مختلف در فرم آزاد، آمیکاسین محصور در لیپوزوم ها، لیپوزوم های خالی در ترکیب با داروی آزاد و لیپوزوم های خالی با شمارش باکتری ها در زمان های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. برای رسم منحنی مرگ باکتری ها در زمان های ذکر شده پseudomonas آئروژینوزا را روی محیط بلاد آگار کشت داده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از طی این مدت ۳-۵ کلنی از کشت خالص برداشته و در محیط مولر هیتون برات تلقیح نموده، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند در نرمال سالین ۰/۸۵ درصد تهیه گردید. در این شرایط تعداد باکتری ها حدود $108 \text{ CFU/ml} * 1/5$ می باشد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون استاندارد به لوله های کشت حاوی ۲ میلی لیتر محیط مولر هیتون برات افزوده شد که به صورت مجزا حاوی آمیکاسین به فرم آزاد در غلظت های $8, 6, 4, 2, 1 \text{ g}/\mu\text{l}$ ، آمیکاسین به فرم لیپوزومی، آمیکاسین آزاد به علاوه لیپوزوم های خالی و لیپوزوم های خالی به تنهایی بودند. این لوله ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد با حرکت دادن مداوم در انکوباتور شیکر دار قرار داده شدند. سپس در زمان های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ با برداشت ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به روش رقت های متوالی، تعداد باکتری های زنده شمارش شدند (۱۰).

یافته ها :

نتایج حاصل از تعیین کارایی محصور سازی یا به عبارت دیگر درصد داروی محلول در آبی که طی ساخت لیپوزومها در آنها محصور گردیده نشان داد که $0/59 \pm 56/19$ آمیکاسین در مقایسه با میزان اولیه آمیکاسین در محلول درون لیپوزومها محصور گردید. نتایج حاصل از تعیین مقدار MIC نشان داد غلظت 2 g/ml داروی آمیکاسین در فرم آزاد و غلظت 4 g/ml در فرم لیپوزومی باعث مهار رشد پseudomonas آئروژینوزا می شوند. در بررسی نتایج حاصل از تعیین MIC لیپوزوم های خالی همراه با داروی آمیکاسین در فرم آزاد نشان داده شد که

مقدار آمیکاسین موجود در هر میلی لیتر نمونه. در صد محصور سازی مقدار آمیکاسین مورد مصرف برای ساخت هر میلی لیتر نمونه

بررسی با دستگاه HPLC :

جهت بررسی با دستگاه HPLC به صورت خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه حاوی آمیکاسین را به ۱۰۰ میکرولیتر سود و ۱ میلی لیتر بافر فسفات ۱۱ pH افزوده و ۳۰ ثانیه مخلوط گردید. سپس به این محلول ۲ میلی لیتر دی کلرومتان افزوده بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه با قدرت 3200 rpm سانتریفیوژ گردید و ادامه مراحل روی فاز مایبی صورت گرفت. به مایع حاصل از مرحله قبل ۱ میلی لیتر واکشنر مشتق ساز و ۵۰۰ میلی گرم سدیم کربنات افزوده شد و پس از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه با قدرت 3200 rpm سانتریفیوژ گردید، در نهایت ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه تزریق گردید (۸).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد:

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) آمیکاسین در فرم آزاد و لیپوزومی از روش تهیه رقت در برات (ماکرو دایلویشن) طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and laboratory standards institute) استفاده شد. محلول استوک آنتی بیوتیک (آمیکاسین) در آب مقطر استریل تهیه و در شرایط انجماد 70°C - تا زمان استفاده نگاه داری می شد. در سری آزمایش رقت های سریال به صورت $0/0625, 0/0312, 0/0156, 0/0078$ ، $5/0, 25/0, 125/0, 64$ و 128 میکروگرم در میلی لیتر و یک لوله به عنوان کنترل مثبت (فاقد آنتی بیوتیک) استفاده می شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد آزمایش در سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیونی معادل با کدورت $0/5$ استاندارد مک فارلند تهیه شد. پس از تلقیح محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک آنها را به گرمخانه 35°C انتقال داده و ۲۴ ساعت کامل اجازه رشد داده می شد. سری لوله ها بعد از ۲۴ ساعت برای رشد باکتری ها به صورت ایجاد کدورت به صورت چشمی بررسی می شدند. هرگونه ایجاد کدورت (بصورت مشخص یا مختصر) مقاومت نسبت به آن رقت تلقی می شد. حداقل غلظتی که باکتری هیچگونه رشد قابل مشاهده در آن نداشت به عنوان MIC تعیین شد (۹).

برای تعیین MIC آمیکاسین به فرم لیپوزومی مطابق روش آمیکاسین به فرم آزاد عمل شد. به این ترتیب که رقت های سریال از این آنتی بیوتیک را درون لیپوزومها محصور نموده و در روش

لیپوزوم های خالی هیچ فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری سودوموناس آئروژینوزا نداشتند در جدول شماره 1 نتایج حاصل از آزمایش های MIC آورده شده است .

لیپوزوم های خالی همراه با داروی آمیکاسین در فرم آزاد دارای نتایج مشابه دارو در فرم آزاد بودند، همچنین در بررسی اثر لیپوزوم های خالی روی رشد باکتری ها مشخص شد، که

جدول ۱: اثر ضد میکروبی آمیکاسین در فرمهای آزاد و لیپوزومی روی پسودوموناس آئروژینوزا در برون تن

حداقل غلظت مهار کنندگی دارو			
لیپوزومهای خالی + آمیکاسین آزاد	آمیکاسین در فرم لیپوزومی	آمیکاسین در فرم آزاد	باکتری
۲ μg/ml	۴ μg/ml	۲ μg/ml	پسودوموناس آئروژینوزا

ضدمیکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین و مقایسه آن با اثر آمیکاسین به فرم آزاد پرداخته شده است. تا بحال مطالعات فراوانی روی لیپوزوم های حاوی آنتی بیوتیک های مختلف و اثرات ضدمیکروبی آنها صورت گرفته است. از جمله آنها می توان به مطالعه Omri اشاره کرد. در این مطالعه اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین بر باکتری پسودوموناس آئروژینوزا بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان داده است که MIC دارو در فرم لیپوزومی آمیکاسین نسبت به فرم آزاد افزایش نشان دارد. مقدار MIC نیز که به دست آورده است برابر ۸ میلی گرم در لیتر برای باکتری پسودوموناس آئروژینوزا بود (۱۲). همانطور که ملاحظه می شود در این مطالعه مانند مطالعه حاضر، مقدار MIC تعیین شده است، اما تفاوت آن در دو قسمت اصلی است. اولاً در این تحقیق مقادیر فسفولیپیدهای بکار برده شده با مقادیر فسفولیپیدهای ما متفاوت بوده است. همانطور که مشاهده می شود ما توانسته ایم با تغییراتی که در مقادیر و ترکیب فسفولیپیدها انجام داده ایم میزان MIC را نسبت به مطالعه ایشان به صورت محسوسی کاهش دهیم و این نوید وجود دارد که با مطالعات بیشتر روی نوع و مقادیر فسفولیپیدها بتوان میزان MIC را از فرم آزاد نیز کمتر نمود. ثانیاً روش تعیین MIC در مطالعه Omri، رقت در آگار بوده است، در صورتی که در روش حاضر، تهیه رقت در براث اصلاح شده بکار رفته است. اشکال روش تهیه رقت در آگار در خصوص کار با لیپوزوم ها در این نکته است که جامد بودن محیط کشت مانع از انتشار و ادغام موثر لیپوزوم ها با جداره باکتری ها می شود. مطالعه دیگر مربوط به Mugabe و همکاران است. در این مطالعه اثر

نتایج حاصل از آزمایش سینتیک مرگ در نمودار شماره 1 آورده شده است. در این جدول تغییرات تعداد باکتری ها در زمان های ۸ و ۶، ۴، ۲، ۰ ساعت مجاورت با غلظت MIC آمیکاسین در فرم لیپوزومی و غلظت های مختلف آمیکاسین آزاد و لیپوزوم فاقد آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده این نکته بود که لیپوزومهای حاوی آمیکاسین با افزایش زمان باعث کاهش بیشتری در تعداد باکتری ها نسبت به نمونه آمیکاسین به فرم آزاد می شوند، بطوری که نسبت کاهش تعداد باکتری در مجاورت با غلظت MIC فرم لیپوزومی (۴ μg/ml) بعد از گذشت ۸ ساعت، در حدود نسبت کاهش تعداد باکتری ها در غلظت ۶ μg/ml آمیکاسین در فرم آزاد بعد از گذشت ۴ ساعت می گردد .

بحث:

مشکل عمده در درمان عفونت های ناشی از این باکتری، مقاومت بسیار زیاد آن در برابر مواد ضدمیکروبی از جمله آنتی بیوتیک ها است. معمولاً این مقاومت ناشی از مقاومت ذاتی و عدم نفوذپذیری مواد ضدمیکروبی به درون باکتری است. پیدایش سویه های دارای مقاومت چندگانه، این مشکل را چند برابر کرده است و باعث ایجاد معضل بسیار زیادی شده است (۳). این حالت خصوصاً در برخی بیماری ها از قبیل فیروز سیستمیک و مواردی مانند سوختگی ها به خوبی مشاهده می شود (۱۱ و ۱۰). با توجه به رویکرد جدیدی که نسبت به استفاده از سیستم های حامل دارویی ایجاد شده، از این سیستم ها ممکن است در درمان عفونت ها استفاده شود. در این راستا پسودوموناس آئروژینوزا همواره یکی از باکتری های مورد بررسی است. در مطالعه حاضر به بررسی اثر

ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین، توبرامایسین و جنتامایسین به روش تهیه رقت در برات روی رشد *Pseudomonas aeruginosa* آثرورژینوزا در زمان های مختلف بررسی شده است. ایشان مشخص کرده اند که میزان MIC آمیکاسین در فرم لیپوزومی در مقایسه با فرم آزاد کمتر بوده است. همانطور که ملاحظه می شود، در این مطالعه نیز اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین تأیید شده است (۱۳). با انجام همین آزمایش با غلظت های مختلف آمیکاسین آزاد و بررسی تغییرات تعداد باکتری ها در زمان های مختلف و مقایسه نتایج آن با آزمایش قبل، اطلاعاتی حاصل می آید که می توان تا حدودی مقایسه کرد که میزان عملکرد لیپوزوم های حاوی آمیکاسین، اثری برابر با چه مقدار آنتی بیوتیک را دارد. به طوری که نسبت کاهش تعداد باکتری در مجاورت باغلظت MIC، $\mu\text{g/ml}$ ۴ فرم لیپوزومی بعد از گذشت ۸ ساعت، در حدود نسبت کاهش تعداد باکتری ها در غلظت $\mu\text{g/ml}$ 6 آمیکاسین در فرم آزاد بعد از گذشت ۴ ساعت می گردد. در مطالعه دیگری که توسط Omri و همکاران روی اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین علیه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت مختلف انجام گرفته است، نشان داده شده که مقدار MIC لیپوزوم های حاوی آمیکاسین و آمیکاسین در فرم آزاد به ترتیب برابر ۱۶ و ۲ میلی گرم در لیتر می باشد. تفاوت مطالعه اخیر با مطالعه ما نوع و میزان فسفولیپیدهای بکار رفته، است، بنحوی که در بررسی ما میزان MIC بدست آمده برای فرم لیپوزومی 3 برابر پایین تر از مطالعه ایشان است (۱۴). با توجه به تأثیر فرم آزاد و لیپوزومی آمیکاسین

در غلظت MIC مشاهده می شود که اثر ضد میکروبی فرم لیپوزومی به کندی و دیرتر از فرم آزاد صورت می گیرد. همچنین در مقایسه نتایج حاصل از آزمایشات MIC حداقل غلظت مهار کنندگی فرم آزاد در مقایسه با فرم لیپوزومی افزایش می یابد. این امر اینگونه توجیه می شود که کلیه داروی محصور در لیپوزوم با باکتری وارد واکنش نمی شوند. در عین حال لیپوزوم های حاوی آمیکاسین توزیع متفاوتی نسبت به فرم آزاد در بدن داشته لذا از تجمع دارو در ارگان هایی نظیر گوش و کلیه جلوگیری نموده و عوارض جانبی کاهش می یابد (۱۲).

نتیجه گیری:

هرچند اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین بر *Pseudomonas aeruginosa* دیده شد، اما تکرار آزمایش با روش ها و مواد مختلف لازم می باشد. همچنین اثر خوب لیپوزوم های حاوی آمیکاسین می تواند این نوید را بدهد که دریچه ای جدید به سمت مبارزه با این میکروارگانیسم فرصت طلب برای ما باز شده است. البته برای رسیدن به هدف نهایی مراحل متعدد دیگری باقی مانده است که در تحقیقات بعدی باید مد نظر قرار گیرد. بررسی اثر فرمولاسیون های آنتی بیوتیک های مختلف به فرم لیپوزومی بر *Pseudomonas aeruginosa* و سایر میکروارگانیسم ها، بررسی اثرات سمی آن در کشت سلولی و اثرات درمانی آن در مدل های حیوانی، توصیه می شود.

فهرست مراجع:

- Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis 1998; 27: 93-99.
- Hauser AR, Sriram P. Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. Tackling the conundrum of drug resistance. Postgrad. Med 2005; 117: 41-48.
- Hill DBR, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, et al. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. J Clin Microbiol 2005. 43: 5085-90.
- Moghimi, SM, Hunter AC, Murrug JC. Long – circulating and target – specific nanoparticles: Theory to practice. Pharmacol.Rev 2001; 53: 283-318.
- Deamer W, Uster S, 1993. Liposome preparation: Methods and mechanisms in: "Liposomes", edited by Marc, J. Ostro. Marcel Dekker, Inc. pp: 510-27 .
- Baron EJ and Finegold SM. Diagnostic Microbiology. 11th ed. Mosby company, New York, 171- 86.
- Ravaoarinoro M, Toma E, Agbaba O, Morisset R. Efficient entrapment of amikacin and teicoplanin in liposomes. J Drugs Targeting 1993; 26: 239-250.
- Poyner EA, Alpar HO, and Brown MRW. Preparation and the effects of free and liposomal tobramycin on siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1994; 34: 43-52.

9. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2003. Approved standard-6th ed. M7-A6. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa.
10. Beaujac C, Sachetelli S, Lagace J. In vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentration of liposome-encapsulated antibiotic agents gram-positive and gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1998; **41**: 35-41.
11. Omri, A., and M. Ravaoarino. 1996. Comparison of the bactericidal action of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 170-176.
12. Omri, A, Ravaoarino. Comparison of the bactericidal action of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **42**: 170-6.
13. Mugabe C, Azghani AO, Omri A. Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. *Int J Pharma* 2006; **307**: 244-50.
14. Omri, A, Ravaoarino, M. Preparation properties and the effects of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation on agents gram-positive and gram-negative bacteria. *J Antimicrob Agent* 1996; **7**: 9-14.