

## 시험관내에서 Enrofloxacin과 Colistin의 병용투여시 상호작용과 항균물질들의 독소중화능

박승춘<sup>1</sup> · 김민규\* · 윤효인\* · 오태광

한국과학기술원 생명공학연구소

\*충남대학교 수의과대학 약리독성학실험실

## Interaction of Enrofloxacin-Colistin Combination and LPS-Neutralization of the Different Antibiotic Classes In Vitro

Seung Chun Park<sup>1</sup>, Min Que Kim\*, Hyo In Yun\* and Tae Kwang Oh

Microbial Enzyme RU, Korea Research Ins. of Biosci. and Biotechn.,  
KIST, P.O. Box 115, Yusong-ku, Taejeon, Korea

\*College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, 220  
Kung-dong, Yusong-ku, Taejeon 305-764, Korea

(Received April 25, 1997)

(Accepted May 10, 1997)

**Abstract :** In the present study, we investigated the neutralization activity of various antimicrobials against lipopolysaccharide (LPS) as well as interaction between two antimicrobials (enrofloxacin and colistin) using checkerboard method. The neutralization activity of antimicrobials used in the test was assayed by means of LAL chromogenic test after reaction of LPS with colistin, enrofloxacin, ampicillin, polymyxin B, oxytetracycline, streptomycin, and erythromycin. As the results, the neutralization activity of colistin and polymyxin B had a more stronger than that of tested other antimicrobials. In bacterial culture broth, the best neutralization activity of the antibiotics was also shown to colistin and polymyxin B. Meanwhile, It was shown to have synergism between enrofloxacin and colistin on the basis of FIC (fractional inhibition concentration). The FIC of enrofloxacin-colistin combinations was 0.50-1.03 to *Staphylococcus aureus* R-209, 1.03-1.06 to *Salmonella typhimurium*, 0.75-1.25 to *Bordetella Bronchiseptica* and 1.02-1.25 to *E. coli* K88ab. On the basis of the above results, the present study may be of clinical usefulness in the choice of an antibiotic therapy for severe sepsis in animals.

**Key Words :** Lipopolysaccharide, Enrofloxacin, Colistin, Endotoxin, Antibacterials.

### I. 서 론

그람음성 세균 감염증에 우수한 항균력을 갖고있는 항균제를 체내에 투여하여도 높은 치사율이 보고되고 있는데, 이러한 높은 치사율은 그람음성세균으로부터 방출되는 내독소(endotoxin)로 인한 쇼크가 동반될 때 더욱 높게 나타난다. 이러한 이유는 항균제에 의하여 노출된 병원성 세균이 사멸되면서 내독소가 다량 세균에서 방출되어 체내에 작용하는 것으로 알려져 있다 (Kreger 등, 1980).

내독소 즉 Lipopolysaccharide(이하 LPS)는 그람음성

세균벽의 외막을 구성하는 주요한 인자로서 LPS의 lipid A 부분이 혈류에 순환하게 되면 단핵구 식균세포와 여러 세포를 자극하여 내인성 중계자(endogenous mediator)인 tumor necrosis factor alpha(TNF-alpha), interleukin 1, 6와 여러 cytokine들의 분비를 유도하는 것으로 알려져 있다(Bone, 1991). 분비된 내인성 중계자들은 또 다시 2차 염증 중계자를 자극하여, 결국 내피 세포가 파괴가 되고 혈류의 방해와 대사의 장애를 일으켜 결국 동물을 치사에 이르게 한다(Jan 등, 1994).

수의임상에서 세균감염증에 있어서의 항균요법은 단일투여에 의한 요법보다는 대부분 복합투여로 이루어지고 있으며, 이러한 복합투여의 장점으로 첫번째는 단일 항균제에 의한 항균범위를 2개의 항균제를 병용

<sup>1</sup>To whom all correspondence should be addressed.

투여시 그 범위를 확대시킬 수 있으며, 두번째는 한 개의 항균제 농도에 의한 독성을 2개의 항균제를 병용투여하였을 때 그 농도를 낮출 수가 있어 독성을 저하시킬 수 있으며, 세번째는 단일 항균제에 내성을 획득하더라도 병용 항균제에 의한 항균작용에 의해 결국은 세균의 내성 획득을 막아줌으로서 치료 효과를 높힐 수가 있다(Jawetz 등, 1950; Roland 등, 1991; Bentley 등, 1987; Levison 등, 1990). 그러나, 이러한 항균제제의 복합 투여의 경우에는 병원성 미생물 치료에는 상당한 효과가 있지만, 상기한 바와 같이 병원성 세균의 치사와 함께 분비되는 많은 LPS로 인하여 오히려 동물의 생존을 위협하는 부작용의 문제가 있었다.

따라서, 효과적으로 항균물질을 복합 투여하기 위해서는 항균 효능과 아울러 병원성 세균이 치사시 분비하는 LPS를 중화할 수 있는 항균물질에 관한 연구가 시급한 실정이다. 하지만, 현재까지 수의 임상용을 위해 국내에서 개발된 복합 항균제제는 항균력에 국한하여 제제가 개발되어왔기 때문에 병원성세균의 사멸시 분비되는 LPS의 중화에는 미흡한 점이 많이 있었다.

그러므로 본 연구에서는 국내에서 많이 사용되고 있는 여러 항균물질들의 LPS 중화능에 관한 기초성적을 얻고, 나아가 수의 임상에 널리 사용되고 있는 enrofloxacin과 colistin의 시험관내에서의 상호작용에 관한 기초연구를 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 항균물질의 독소중화능

국내에서 동물의 세균감염증에 많이 사용되는 항균물질과 병원성세균에서 분비되는 LPS 및 순수분리정제된 LPS와 상호작용을 구명하기 위하여 실험을 실시하였다.

#### 1) 항균제

실험에 사용한 항균물질은 enrofloxacin, colistin, streptomycin, ampicillin, erythromycin, streptomycin, polymixin B 그리고 oxytetracycline의 원료를 (주)대성미생물연구소로부터 제공을 받아 실험에 사용하였으며, 각 항균물질들의 원료는 98-104%의 고순도 물질로서 LPS의 함량이 없는 것을 확인 후 실험에 공하였다.

#### 2) LPS의 측정

항균물질과 LPS의 상호작용을 구명하기 위하여 순수분리된 LPS(Sigma, *E. coli* 05:11B)를 실험에 이용하

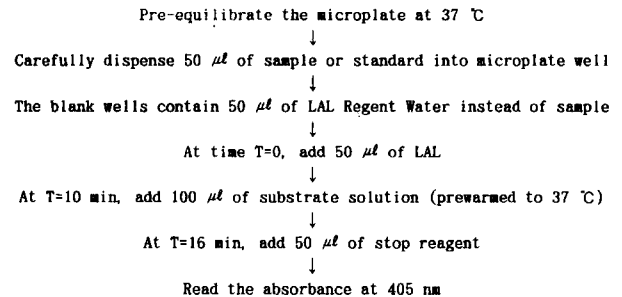


Fig. 1. Procedure of LAL (Limulus Amebocyte Lysate) test for quantification of LPS.

였다. 한편, 항균물질이 시험관내에서 병원성세균인 *Escherichia coli* K88ab에 투여시 LPS의 분비 양상을 알아보고자 하였다. LPS의 정량(Marilyn 등, 1983)을 위하여 표준곡선은 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 4 EU/ml로 관계식을 구하였으며, LPS의 정량은 Fig. 1의 방법으로 실시하였다.

### 2. 시험관내에서 enrofloxacin과 colistin의 상호작용

#### 1) 항균물질

앞선 시험인 LPS 측정시험에서 선별된 enrofloxacin과 colistin의 원료를 (주)대성미생물연구소에서 제공받아 실험에 사용하였으며, 각 항균물질들의 원료는 98-102%의 고순도 물질로서 LPS의 함량이 없는 것을 확인 후 실험에 공하였다.

#### 2) 시험균주

시험에 사용한 균주는 가축유래병원성세균으로 그람 음성균주인 *E. coli* K88ab, *Pasteurella multocida* type-A, *Salmonella typhimurium*, *Bordetella bronchiseptica*와 그람양성균주인 *Staphylococcus aureus* R-209로 총 5균주를 (주)대성미생물연구소에서 분양받았으며, 분양받은 세균의 전배양은 TSB(tryptic soybean broth) 배지를 이용하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 하루전에 멸균하여 굳힌 TSA(tryptic soybean agar) 배지에 균을 도말하여 집락이 적절하게 형성되도록 한 후 4°C에 보관하면서 종균으로 사용하였다.

#### 3) Cherkboard method

시험관내에서 enrofloxacin과 colistin의 병용투여시 시험균주에 대한 상호작용을 알아보기 위하여 검정균주를 종균 보관용 배지에서 1개의 집락을 취하여 전배양하였다. 전배양에 사용한 배지는 TSB(tryptic soybean broth)배지를 이용하여 37°C에서 하룻밤 진탕배

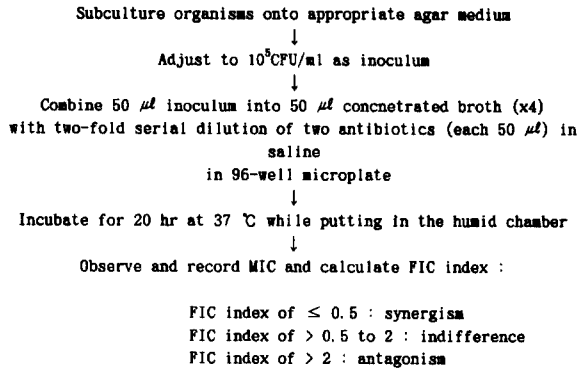


Fig. 2. Procedure of Checkerboard method to determine antibacterial activity between two antibacterials on the basis of FIC (fractional inhibition concentration).

양한 후 하루전에 멸균하여 굳힌 TSA 배지에 균을 도말하여 집락이 적절하게 형성되도록 하였다. 집락이 형성된 배지에서 1개의 집락을 취하여 Fig. 2에 도시한 방법에 따라 실험을 실시하였다.

### III. 결과 및 고찰

그람음성세균의 감염증 치료를 효과적으로 수행하기 위해서는 2가지 요소가 고려되어야 한다. 그 첫번째는 항균물질과 감염세균의 관계로 사용하고자 하는 항균물질이 원인균에 감수성이 있어야 한다. 이러한 원칙은 항균요법에 선행되어야 하는 필수적인 요소라고 볼 수 있다. 그러므로 적절한 항균제의 선택은 성공적인 항균요법의 과제인 것이다. 그러나 대부분 환축에 있어서 항균요법은 현재 임상경험에 의존하고 있다(Jan 등, 1994).

최근 국내에서 광범위 항균제인 퀴놀론계통의 항균제를 많이 사용하고 있으며 이 항균제에 대한 많은 내성균주 출현이 우려되고 있다. 퀴놀론 항균물질이 세균에 대한 작용기전은 세균의 DNA gyrase의 작용을 억제함으로써 세균이 생육하는 데 필요한 단백질합성을 저해하여 항균효력을 나타내는 강력한 살균성 항균물질이다. 이 항균물질의 특성은 plasmid에 의하여 항균제 내성을 획득하는 것이 아니므로 내성균의 출현이 상당히 어려운 것으로 보고되어 있다(Wolfson과 Hopper, 1985). 특히, enrofloxacin는 수의임상용으로 개발되어진 최초의 불소함유 퀴놀론 항균물질로서 국내외적으로 많이 사용되고 있다(Wolfson과 Hopper, 1985). 본 실험에서는 이점에 착안하여 많은 수의임상 항균물질중 LPS 중화능을 가진 항균제와 enrofloxacin을 병용투여할 경우 일어날 수 있는 상호작용에 관하여 실험을 실시하였다.

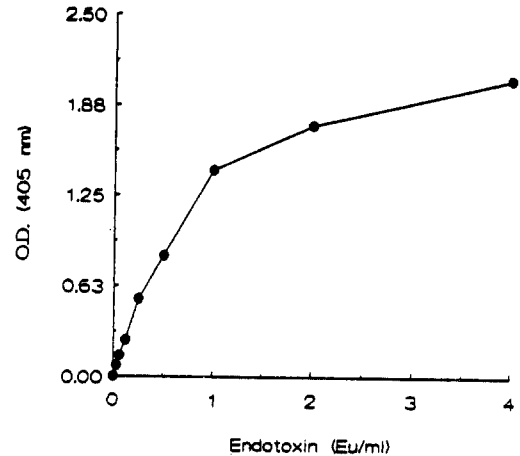


Fig. 3. Standard curve of endotoxin using chromogenic LAL test ( $Y=1.39x+0.169$ ,  $r=0.97$ ).

#### 1. LPS의 정량곡선

시판 항균물질들이 LPS와 결합능 혹은 중화능이 있는지 알아보기 위하여 먼저 LPS의 농도에 따른 직선식을 구하기 위하여 실험을 실시한 결과  $Y=1.39x+0.169$ ( $r=0.97$ )의 관계식을 갖는 것으로 나타났다. 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

#### 2. 항균물질과 LPS의 결합능

시판 항균물질이 LPS와 직접적으로 결합하는지 알아보기 위하여 순수정제된 LPS와 항균물질을 시험관 내에서 반응시킨 결과를 Table 1에 나타내었다. LPS는 5 EU/ml의 농도로 고정시키고 항균물질은 2  $\mu$ g/ml로 일정한 농도를 만들었다. 반응 완충용액은 Tris-HCl 용액으로 pH는 8.0으로 만들었으며, 항균물질의 pH는 LPS가 함유되어있지 않은 HCl 혹은 NaOH로 항균물질이 함유된 용액의 pH를 8.0으로 유지시켜 반응하였다. 그 결과 시판항균물질중에서 colistin과 polymixin B는 평균 1.73 EU/ml와 1.77 EU/ml의 LPS와 결합하는 것을 보여주었다. Enrofloxacin, ampicillin, oxytetracycline 그리고 erythromycin은 대조구와 결합능을 비교시 유의한 차이점을 보여주지 않아 LPS와 결합하지 않는 것으로 나타났다. 한편, streptomycin은 대조구와 비교시 0.67 EU/ml가 LPS에 결합한 것으로 나타났다.

#### 3. 항균물질과 세균에서 분비되는 LPS의 상호작용

세균이 항균물질에 노출시 세균으로부터 분비되는

**Table 1.** The neutralization activity of various antimicrobials against *E. coli* LPS using chromogenic LAL test

Antimicrobials	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	LPS (EU/ml)	Mean (SD) amount of LPS detected (EU/ml)	Percentage of LPS-antibiotics binding (%)
Control	5	2	1.74 $\pm$ 0.23	13.0
Colistin	5	2	0.27 $\pm$ 0.14	86.5
Enrofloxacin	5	2	1.69 $\pm$ 0.42	15.5
Ampicillin	5	2	1.76 $\pm$ 0.34	12.0
Polymixin B	5	2	0.23 $\pm$ 0.11	88.5
Oxytetracycline	5	2	1.67 $\pm$ 0.43	16.5
Streptomycin	5	2	1.07 $\pm$ 0.11	46.5
Erythromycin	5	2	1.69 $\pm$ 0.54	15.5

LPS가 항균물질과 직접적으로 반응을 하는지를 알아 보기 위하여 실험을 실시한 결과를 Table 2에 요약하였다. Table 2에서 표기한 것처럼 *E. coli* K88ab에서 자연적으로 발생하는 LPS의 양은 36.69 EU/ml이었다. 그러나 colistin과 균주가 반응시 28.16 EU/ml로 반응 전의 LPS의 양과 비교시 133.76 EU/ml이 항균제와 결합한 것을 알 수 있었다. 즉 colistin 1  $\mu\text{g/ml}$ 에 2.62 EU/ml로 1 EU/ml는 1  $\mu\text{g/ml}$ 으로 2.62  $\mu\text{g/ml}$ 이 결합한다는 사실을 알 수 있었다. 위의 실험에서 알 수 있듯이 실험한 항균물질중 구조에 따라 LPS의 중화능은 상당한 차이를 보여주었다. Colistin과 polymixin B가 가장 좋은 중화능을 보여주었으며, erythromycin과 streptomycin은 대조구와 비교시 LPS의 분비량이 56.60 EU/ml과 3.57 EU/ml로 LPS의 분비를 억제함을 보여주었다.

Colistin은 양이온을 띠는 peptide 항균물질로서 세균의 세포막에 작용하며 항균작용을 나타내는 항균물질로 동물 체내의 장내에서도 거의 흡수가 되지 않는 것으로 알려져있다. 이러한 colistin의 특성은 결국 세균 세포막을 구성하고 있는 LPS에 강한 결합을 하는 것에 기인하는데 LPS는 화학적인 성상이 음이온으로 구성되어 colistin과 강한 결합을 하는 것으로 보고되어 있다(Warren 등, 1985). 이러한 사실로부터 빠르게 살균력을 발휘하는 항균제는 세균이 사멸하면서 대량의 LPS를 분비하므로 colistin과 병용투여시 분비된 LPS와 결합하여 LPS로 야기되는 체내 병리현상을 예방할 수 있을 것으로 사료된다(Jan 등 1994). Warren 등 (1985)은 colistin을 이용하여 LPS의 중화 및 결합력을 실험하였다. 그들은 LPS 2,590  $\mu\text{g/ml}$ 을 50%억제하는 colistin의 농도는 500  $\mu\text{g/ml}$ 로 무게 중량비로 볼 때 5.2:1이라 보고하였다. 또한 1,360  $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS의 50% 억제 농도는 colistin의 농도는 350  $\mu\text{g/ml}$ 로 중량 무게비로는 3.9:1로 보고하였다. 이들은 LPS의 측정방법은 결합하지 않은 colistin을 미생물학적방법으로 측정하

**Table 2.** Secretion of LPS from *E. coli* K88ab before and after exposure of antibiotics

Antimicrobials	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Before (EU/ml)	After (EU/ml)	Secretion ( $\mu\text{g/ml}$ )
Control	50	177.27	216.96 $\pm$ 18.81	36.69 $\pm$ 18.82
Colistin	50	161.92	28.16 $\pm$ 0.90	-133.76 $\pm$ 0.90
Enrofloxacin	50	156.81	306.39 $\pm$ 9.59	149.58 $\pm$ 9.60
Ampicillin	50	177.27	306.07 $\pm$ 8.03	128.80 $\pm$ 8.04
Polymixin B	50	164.32	16.34 $\pm$ 0.77	-147.98 $\pm$ 0.77
Oxytetracycline	50	168.45	303.19 $\pm$ 5.70	134.74 $\pm$ 5.70
Erythromycin	50	177.27	233.87 $\pm$ 10.39	56.60 $\pm$ 10.39
Streptomycin	50	167.23	170.80 $\pm$ 4.93	3.57 $\pm$ 1.93

여 낮은 농도에서의 함량측정은 불가능하였다. 그러나, 본 실험에서는 Marilyn 등(1983)이 이용한 LAL 측정방법으로 실험을 실시한 결과, 무게 중량비로 LPS:colistin의 결합비율은 2.62:1의 비율로 나타났다. 이러한 결합비율의 차이점은 LPS와 항균제의 고농도 반응에 의한 결과로 생각되며 또한 측정방법이 상이한 결과에서 비롯되는 것으로 생각된다. 그러나 전체적인 경향은 colistin은 LPS에 직접적으로 결합하는 것을 알 수가 있었으며, 이러한 결합력은 colistin의 양이온의 성질과 LPS의 음이온 성질에 의한 것으로 대단히 빠른 반응속도를 갖고있는 것으로 나타났다(Heather 등 1994). Ampicillin, enrofloxacin과 oxytetracycline은 Table 2에 요약한 것처럼 세균을 죽이면서 많은양의 LPS가 세균에서 분비되는 사실을 확인할 수 있었다. 한편, streptomycin은 세균에서 분비되는 LPS의 양이 앞의 항균제보다 상당히 적은량을 분비하였다. 이러한 사실로 이 항균제는 LPS에 직접적으로 결합하기 보다는 세균의 protein의 합성을 억제하여 LPS의 생성을 억제하는 것으로 생각되었고, 부분적으로 LPS와도 직접적인 작용을 하는 것으로 생각되었다(Wolfson과 Hopper, 1985).

## 2. Enrofloxacin과 colistin의 상호작용

강력한 살균력을 갖고있는 enrofloxacin과 앞의 실험에서 내독소 결합력이 있는 colistin을 시험관내에서 병용투여시 일어나는 상호작용을 checkerboard 방법으로 동물유래병원성세균에 대하여 실험을 하였다(Diane과 Michael, 1996). 검정균주 *P. multocida* type A, *E. coli* K88ab, *S. aureus* R-209, *S. typhimurium*과 *B. brochiseptica*에 대하여 두 항균제의 상호작용 결과를 FIC Index를 이용하여 판독하였다. 그 결과를 Table 3, 4, 5, 6, 7에 요약하였다. *P. multocida* type A을 시험균주로 FIC값은 1.00에서 1.50으로 상가 혹은 불간섭작

**Table 3.** The combination test of colistin and enrofloxacin against *P. multocida* type A

Alone		Combination		FIC index	Ratio	
colistin	enrofloxacin	colistin	enrofloxacin		colistin (1:)	enrofloxacin (1:)
3.9	0.078	1.95	0.039	1.00	0.02	50.00
3.9	0.078	1.95	0.078	1.50	0.04	25.00
3.9	0.078	0.97	0.078	1.25	0.08	12.44
3.9	0.078	0.49	0.078	1.12	0.16	6.24
3.9	0.078	0.24	0.078	1.06	0.32	3.10

**Table 4.** The combination test of colistin and enrofloxacin against *E. coli* K88ab

Alone		Combination		FIC index	Ratio	
colistin	enrofloxacin	colistin	enrofloxacin		colistin (1:)	enrofloxacin (1:)
125	0.156	31.25	0.156	1.25	0.0050	200.32
125	0.156	15.62	0.156	1.12	0.01	100.13
125	0.156	7.81	0.156	1.06	0.02	50.06
125	0.156	3.9	0.156	1.03	0.04	25.00
125	0.156	1.95	0.156	1.02	0.08	12.50

**Table 5.** The combination test of colistin and enrofloxacin against *S. aureus* R-209

Alone		Combination		FIC index	Ratio	
colistin	enrofloxacin	colistin	enrofloxacin		colistin (1:)	enrofloxacin (1:)
125	0.312	31.25	0.078	0.50	0.0025	400.64
125	0.312	15.62	0.156	0.62	0.01	100.13
125	0.312	15.62	0.312	1.12	0.02	50.06
125	0.312	7.81	0.312	1.06	0.04	25.03
125	0.312	3.9	0.312	1.03	0.08	12.50

**Table 6.** The combination test of colistin and enrofloxacin against *S. typhimurium*

Alone		Combination		FIC index	Ratio	
colistin	enrofloxacin	colistin	enrofloxacin		colistin (1:)	enrofloxacin (1:)
125	0.312	15.62	0.312	1.12	0.02	50.06
125	0.312	15.62	0.312	1.12	0.02	50.06
125	0.312	7.81	0.312	1.06	0.04	25.03
125	0.312	7.81	0.312	1.06	0.04	25.03
125	0.312	3.9	0.312	1.03	0.08	12.50

**Table 7.** The combination test of colistin and enrofloxacin against *B. bronchiseptica*

Alone		Combination		FIC index	Ratio	
colistin	enrofloxacin	colistin	enrofloxacin		colistin (1:)	enrofloxacin (1:)
62.5	0.156	31.25	0.039	0.75	0.00	801.28
62.5	0.156	15.62	0.078	0.75	0.00	200.26
62.5	0.156	15.62	0.156	1.25	0.01	100.13
62.5	0.156	7.81	0.156	1.12	0.02	50.06
62.5	0.156	3.9	0.156	1.06	0.04	25.00

용으로 나타났다. *E. coli* K88ab에 대한 FIC값은 1.25에서 1.02로 두 항균제의 불간섭현상을 관찰하였다. 그람 양성균주인 *S. aureus* R-209의 경우 0.5에서 1.03으로 확실한 상가작용과 불간섭현상을 보여주었다. 이러한 결과는 colistin이 세포막에 작용하여 enrofloxacin을 세균내로 유입을 촉진시키는 것으로 사료되며 이러한

현상을 알기위하여 현재 항생제 농도에 의한 균의 사멸속도 및 기전연구를 실험중에 있다. *S. typhimurium*과 *B. bronchiseptica*를 시험균주로 FIC값을 측정한 결과 1.03-1.12와 0.75-1.25로 불간섭현상과 상가작용을 역시 관찰할 수 있었다. 위의 결과를 종합하면, 실험한 모든 균주에서 FIC값이 2 이하로 불간섭 혹은

상가작용을 보여주었다. 즉, 단일제제의 MIC(Minimum Inhibition Concentration)의 값이 두제제로 구성하여 투여시 MIC값이 낮아졌으며, 두제제의 구성비율에 따라 FIC값은 연동하였다. 항균력의 관점에서 그람음성균주를 사용할 때 enrofloxacin의 농도에 의하여 FIC값 차이를 보여주었다. 그러나 그람양성균주에서는 enrofloxacin보다 colistin의 농도에 의하여 FIC값이 변하므로 결국은 합제에 의한 실험이 보완되어야 할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Bently, O.E. and Cummis, J.M. (1987): Efficacy of sulbactam, a beta-lactamase inhibitor, combined with ampicillin in the therapy of ampicillin-resistant pneumonic pasteurellosis in feedlot calves. *Can. Vet. J.*, **28**, 591-599.
- Diane, M.C. and Michael, J.R. (1996): Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, **40**, 677-683.
- Heather, A.C., Bion, J.F., Penn, C.W. and Elliott, T.S. J. (1994): Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro. *J. Med. Microbiol.*, **40**, 23-30.
- Jawetz, E., Gunnison, J.B. and Colman, V.R. (1950): The combined action of penicillin with streptomycin or chromycetin on enterococci in vitro. *Science.*, **111**, 254-256.
- Jan, M.P., Sander J.H., Van D., Kuljper E.D. and Peter, S. (1994): Clinical relevance of antibiotic-induced endotoxin release. *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, **38**, 1211-1218
- Kreger, B.E., Craven, D.E. and McCabe, W.R. (1980): Gram-negative bacteremia. IV. Reevaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *Am. J. Med.* **68**, 344-355.
- Levison, M.E., Mangura, C.T. Lober, B., Abrutyn, E., Pesanti, E.L., Levy, R.S., MacGregor, R.R. and Schwartz, A.R. (1990): Clindamycin compared with penicillin for the treatment of anaerobic lung abscess. *Annual Inter. Med.*, **98**, 466-471.
- Marilyn. J.C., Sally., S.R. and Thomas., J.N. (1983): Detection of endotoxin in antibiotic solutions with *Limulus* Amebocyte Lysate. *Antimicrob. Agent. Chemotherap.* **23**, 649-652.
- Roland, L.E., Bigen, Q.I., Hua, S.U., Nicole, L.Z., Patrice, C. and Jean D. (1991): Effects of combinations of beta-lactams, daptomycin, gentamycin, and glycopeptides against glycopeptide-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemotherap.* **35**, 92-98.
- Warren, H.S., Stephen, A.K. and George, R.S. (1985): Binding and neutralization of bacterial Lipopolysaccharide by colistin nonapeptide. *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, **28**, 107-112.
- Wolfson, J.S. and Hopper, D.C. 1985. The fluoroquinolone; structure, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemotherap.*, **37**, 1393-1399.