

GÜÇ ÜREYEN BAKTERİLERLE (S.PNEUMONIAE, H.INFLUENZAE, M.CATARRHALIS, N.GONORRHOEAE, N.MENINGITIDIS) İLGİLİ ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ VE SORUNLAR

Bülent SÜMERKAN

Antimicrobial susceptibility tests for fastidious bacteria (S.pneumoniae, H.influenzae, M.catarrhalis, N.gonorrhoeae, N.meningitidis) and problems.

Günümüzde dünyanın birçok yerinde uygulanmakta olan antibiyotik duyarlılık testleri ile ilgili yöntemler hızlı üreyen, besin gereksinimleri karmaşık olmayan, üremek için CO₂'ye gereksinim duymayan bakterilere göre standardize edilmiştir. Bu yöntemlerde belirtilen duyarlı, dirençli ve orta duyarlı kategorileri genellikle bu tür bakteri popülasyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiştir. Duyarlılık test yöntemi ne olursa olsun, besiyerinin bileşimi ve inkübasyon koşulları testin en önemli özelliklerindedir. Güç üreyen bakteriler grubunda yer alan ve metin başlığında belirtilen bakteriler, üreyebilmek için katkılı besiyerleri ve CO₂'li ortama gereksinim duyarlar. Bu yüzden diğer bakteriler için standardize edilmiş yöntemlerde kullanılan katkısız Mueller-Hinton besiyeri ile aerop koşullar, sözü edilen bu güç üreyen bakterilerle yapılacak duyarlılık testlerinde uygulanmaz. Bu mikroorganizmalar için yapılacak duyarlılık testlerinde özel yöntemler gerekmektedir. Diğer güç üreyen *Helicobacter*, *Listeria*, *Campylobacter* ve *Brucella* gibi bakteriler için henüz tam anlamıyla oturmuş standart yöntemler geliştirilemediğinden klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu bakterilerle rutin duyarlılık testlerinin yapılması önerilmemektedir.

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Günümüzdeki direnç mekanizmaları ve direnç durumları

Özellikle 1980'li yıllara gelinceye kadar penisilin *Streptococcus pneumoniae* infeksiyonlarının tedavisinde rahatlıkla kullanılan bir antibiyotikti. Bu dönemlerden başlayarak ülkemiz de içinde olmak üzere, dünyanın hemen her yerinden penisiline dirençli pnömokok suşları giderek artan bir sıklıkta bildirilmektedir (1, 2, 16, 22, 34, 38, 47). Bu suşlardan bir grup, yüksek düzey dirençli (MIC \geq 2 μ g/ml), bir grup ise rölatif dirençli (MIC=0.1-1 μ g/ml) suşlardır(33). Penisiline yüksek düzey dirençli pnömokokların neden oldukları infeksiyon türü ne olursa olsun penisilin ile tedavi olanaksızdır. İkinci grupta yer alan suşlarla oluşan menenjit dışındaki infeksiyonlar penisilin ile tedavi edilebilirler. Direnç, pnömokokların penisilinini hedefi olan penisilin-bağlayan-proteinlerde (PBP) meydana getirdiği değişiklik sonucu oluşmaktadır(17). Ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler ve karbapenem gibi diğer beta-laktam antibiyotiklerin etkisi de paralel olarak azalabilir. Bu yüzden penisiline dirençli pnömokok suşları ile oluşan infeksiyonlarda tedavide alternatif olarak geniş spektrumlu sefalosporinler düşünüldüğünde bu antibiyotiklerle uygun duyarlılık testlerinin yapılması gerekir.

Penisiline duyarlı pnömokoklar intrinsek olarak etkisi az olan üç sefalosporin (seftazidim, seftaksim, seftibuten) dışında tüm beta-laktam antibiyotiklere duyarlıdır(12). Bundan başka pnömokoklarda makrolidler, tetrasiklinler ile kloramfenikole dirençte penisiline dirençli suşlarla birlikte bir artış gözlenmektedir(5,22,34). Ayrıca geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli

S.pneumoniae suşları bildirilmiştir(24,48). Vankomisine dirençli suş henüz bildirilmemiştir. *S.pneumoniae* suşlarında son yıllarda gözlenen dirençle ilgili bu gelişmeler doğrultusunda, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen suşların antibiyotik duyarlılık durumları, hızlı ve doğru bir şekilde araştırılmalıdır.

Önerilen test yöntemleri

Laboratuvarlarda kolayca uygulanabilir en pratik yöntem % 5 koyun kanlı Mueller-Hinton agarda (KK-MHA) disk diffüzyon yöntemidir(39). Yöntemin özellikleri tablo 1'de özetlenmiştir. Zon çapları Petri kutusu kapakları açılıp üstten ölçülür. Bu yöntemle penisilin direncini belirlemek için oksasilin (1 µg) diski kullanılır. Penisilin diski kullanılmaz. Oksasilin diski etrafında 19 mm veya daha küçük zon çapı suşun büyük bir olasılıkla penisiline dirençli veya rölatif dirençli olduğunu, 20 mm veya daha büyük zon çapı ise penisiline duyarlı olduğunu gösterir. Disk diffüzyon yöntemi ile direnç kategorilerini ayırdetmek mümkün değildir. Bu ancak minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) tayini ile olur. Bazı penisiline duyarlı *S.pneumoniae* suşları oksasilin diski ile dirençli bulunabilir(23,41). Yine de bu suşlar MIC'leri belirlenene kadar penisiline dirençli olarak kabul edilirler(12).

Tablo 1. *S.pneumoniae*, *H.influenzae* ve *N.gonorrhoeae* için önerilen disk diffüzyon duyarlılık test yöntemleri.

Bakteri	Besiyeri	İnokulum ^a	İnkübasyon süresi ^b
<i>S.pneumoniae</i>	KK-MHA ^c	20-24 saatlik KKA ^d kolonilerinden	20-24 saat
<i>H.influenzae</i>	HTM ^e agar	20-24 saatlik çikolata agar kolonilerinden	16-18 saat
<i>N.gonorrhoeae</i>	GC agar+özel katkı	20-24 saatlik çikolata agar kolonilerinden	20-24 saat

^a 35°C'de % 5-7 CO₂'li ortamda üreyen kolonilerden Mueller-Hinton sıvı besiyerinde veya % 0.9 NaCl'de McFarland standardına göre bulanıklık ayarı.

^b Tüm inkübasyonlar 35°C'de % 5-7'lik CO₂'li ortamda.

^c KK-MHA: Koyun kanlı Mueller-Hinton agar.

^d KKA: Koyun kanlı agar.

^e Haemophilus test medium.

Disk diffüzyon paneline katılacak sefuroksim (30 µg) diski ile pnömokokların geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli olup olmadıkları araştırılabilir. Oksasilin etrafında 19 mm veya daha küçük zon çapı ölçüldüğünde sefuroksim diski etrafında 21-30 mm zon çapı varsa 3. kuşak sefalosporin direnci olabilir. Bu zon çapı 20 mm veya daha küçükse 3. kuşak sefalosporinlere direnç kesindir(13). Bu konuda çalışan araştırmacılar arasında tam fikir birliği yoktur(13,36,49). Goldstein ve ark(14), lorakarbef (10 µg) diski kullanılarak sefotaksime dirençli pnömokokların saptanabileceğini bildirmişlerdir. KK-MHA'da disk diffüzyon yöntemi ile kloramfenikol, eritromisin, ofloksasin, tetrasiklin ve vankomisine karşı duyarlılık testleri yapılabilir(32).

Dilüsyon testleri sıvı makro ve mikrodilüsyon şeklinde katyon katkılı, parçalanmış at eritrositli (% 3-5) Mueller-Hinton sıvı besiyerinde yapılabilir. Bu yöntem (mikro) NCCLS tarafından önerilen standart yöntemdir(40). At eritrositlerinin hazırlanmasındaki güçlük bu yöntemin rutinde uygulanmasını kısıtlar(40,42).

Alternatif test yöntemleri

S.pneumoniae suşlarında MIC tayini için *Haemophilus* test medium (HTM) ile sıvı dilüsyon yöntemleri ile yapılan çalışmalar, bu besiyerinin bazı olumsuzluklarına (örneğin bazı pnömokok suşları bu besiyerinde ürememiştir) rağmen alternatif olabileceğini göstermiştir(4,28,31).

Bu besiyeri ile yapılan testlerde standart yöntemle göre sayıları az da olsa yalancı-duyarlı ve yalancı-dirençli suşlar bulunmuştur. Bu olumsuzluk sınır değerlerde (breakpoint) yapılacak küçük değişikliklerle (örneğin penisilin için direnç sınırı $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ 'ye, duyarlılık sınırı $\leq 0.03 \mu\text{g/ml}$ 'ye çekilmek suretiyle) giderilebilir(28). D'Amato ve ark.(9) hazır mikrodilüsyon panellerine % 5 koyun kanı katarak yaptıkları çalışmada standart yöntemle % 94 oranında uyumlu sonuçlar almışlardır.

S.pneumoniae suşları ile KK-MHA kullanarak agar dilüsyon yöntemi ile MIC tayinleri yapılabilir(40).

E-test (PDM Epsilometer; AB Biodisk, Solna, Sweden) günümüzde MIC tayini için kullanılabilecek kolay ve dilüsyon testlerine göre daha kısa sürede yapılabilen bir testtir(6). *S.pneumoniae* suşları ile yapılan çalışmalarda E-test ile güvenilir ve tekrar edilebilir sonuçlar alınmıştır(21,29,30,37).

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Günümüzdeki direnç mekanizmaları ve direnç durumları

Haemophilus influenzae suşlarının yaklaşık % 20-40'ı TEM-1 tip beta-laktamazları nedeniyle ampisilin ve amoksisiline dirençlidirler(5,27). Ülkemizde ampisilin direnci % 8-52.5 arasında bildirilmiştir(15,35). Beta-laktamaza bağlı ampisilin direnci kapsüllü tip b suşlarda tip b olmayanlara göre 2-4 kat fazladır. Tip b suşların hayatı tehdit eden infeksiyonlara neden oldukları düşünülürse bu direncin önemi çok daha fazladır. *H.influenzae*'de PBP'lerde değişiklik,hücre permeabilitesinde azalma gibi mekanizmalarla da ampisilin direnci bulunabilir(12). Bu suşlar beta-laktamaz testleri ile belirlenemez. Bugün için *H.influenzae*'de dar spektrumlu sefalosporinler dışında sefalosporin direnci nadir olup, 3. kuşak sefalosporinlere halen direnç bildirilmemiştir(5,27). Kloramfenikol direnci de sık değildir.

Önerilen test yöntemleri

H.influenzae için disk diffüzyon test yönteminin genel özellikleri tablo 1'de verilmiştir. Tablo 2'de ise bu bakterilerle ilgili dilüsyon yönteminin özellikleri gösterilmiştir. Bu yöntemler NCCLS'in önerdiği yöntemlerdir. Sonuçların yorumlanması ve kalite kontrolü NCCLS'in M2-A5 (disk diffüzyon) ve M7-A3 (mikrodilüsyon) tablolarına göre yapılmalıdır.

Tablo 2. *S.pneumoniae*, *H.influenzae* ve *N.gonorrhoeae* için önerilen dilüsyon duyarlılık test yöntemleri.

Bakteri	Besiyeri	Dilüsyon tipi	İnokulum ^a	Son konsantrasyon	İnkubasyon koşulları
<i>S.pneumoniae</i>	PAE-MHB ^b	Sıvı mikrodilüsyon	20-24 saatlik koyun kanlı agar kolonilerinden	$5 \times 10^5/\text{ml}$	35°C'de 20-24 saat, aerop
<i>H.influenzae</i>	HTM ^c broth	Sıvı mikrodilüsyon	20-24 saatlik çik. agardaki kolonilerden	$5 \times 10^5/\text{ml}$	35°C'de 20-24 saat, aerop
<i>N.gonorrhoeae</i>	GC+ özel katkı	Agar dilüsyon	20-24 saatlik çik. agardaki kolonilerden	$10^4/\text{spot}$	35°C'de 20-24 saat, % 5-7 CO ₂ 'li ortam

^a Bkz. Tablo 1, dip not a.

^b PAE-MHB: Parçalanmış at eritrositli Mueller-Hinton buyyonu.

^c Haemophilus test medium.

HTM günümüzde *H.influenzae* suşlarında antibiyotik duyarlılık testleri için önerilen besiyeridir(18,45). At eritrositlerinin hazırlanmasındaki güçlük ve çikolata agarda zonların değerlendirilmesindeki zorluklardan dolayı geliştirilen bu besiyeri Mueller-Hinton besiyerine 15 µg/ml hematin (X faktör), 15 µg/ml NAD (V faktör) ve 5 µg/ml maya özeti katılmak suretiyle kolayca hazırlanır. Ticari olarak da sağlanabilir. Ancak kullanıma yeni girmiş olan bu besiyeri ile ilgili halen çözüm bekleyen bazı problemler vardır(3,11).

Alternatif test yöntemleri

Çikolata Mueller-Hinton agar ile disk diffüzyon testleri yapılabilir. Yöntem dört antibiyotik (ampisilin, kloramfenikol, ampisilin/sulbaktam ve amoksisilin/klavulanik asit) için standardize edilmiştir(12, 18). 1990 yılından önce NCCLS'in önerdiği at eritrositleri içeren Mueller-Hinton besiyeri ile sıvı dilüsyon yöntemi kullanılabilir.

E-test ile MIC tayini HTM agar veya çikolata Mueller-Hinton agar ile yapılabilir(30). Diğer metodlara iyi bir alternatif olarak görülmesine rağmen yöntem rutine girmeden önce üzerinde daha fazla araştırma yapılmasında yarar vardır.

MORAXELLA CATARRHALIS

Günümüzdeki direnç mekanizmaları ve direnç durumları

İnsan solunum yollarında patojenitesi son zamanlarda anlaşılan *Moraxella catarrhalis* suşlarının büyük bir kısmı beta-laktamaz sentez eder. Beta-laktamazları kromozomaldır ve sulbaktam ve klavulanik asit ile inhibe olurlar(50). Bu enzimlerin varlığı sadece substrat olarak nitrosetinin kullanıldığı kromojenik yöntemle belirlenebilir. Günümüzde *M.catarrhalis* suşları amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin/sulbaktam,sefalosporinler ve imipeneme duyarlıdırlar. Tetrasiklin ve eritromisin direnci sık değildir(12,15,50).

Önerilen test yöntemleri

NCCLS'in hızlı üreyen bakteriler için önerdiği disk diffüzyon ve agar dilüsyon yöntemleri bu bakteriler için de geçerlidir(39,40).

NEISSERIA GONORRHOEAE

Günümüzdeki direnç mekanizmaları ve direnç durumları

Gonokoklarda bilinen 3 tip antibiyotik direnç mekanizması vardır: 1-Plazmid kaynaklı TEM-1 tip beta-laktamaz, 2-Kromozomal genlerdeki mutasyona bağlı PBP'lerde değişiklik ve permeabilite azalması, 3-Plazmid kaynaklı tetrasiklin direnci(12,26). Birinci mekanizma ile direnç gösteren suşlar penisilin, ampisilin ve amoksisiline dirençlidirler. Beta-laktamaz testleri ile belirlenebilirler. Bu suşlar genellikle penisilin dışı beta-laktamlara duyarlıdırlar. İkinci kategorideki suşlar penisilin yanında tetrasiklin ve bazı sefalosporinlere dirençli olabilirler.

Önerilen test yöntemleri

Neisseria gonorrhoeae sıvı besiyerlerinde otolize olmaya eğilim gösterdiğinden MIC tayinleri ancak agar dilüsyon yöntemleri ile yapılabilir. Disk diffüzyon ve agar dilüsyon testleri için özel katkı GC agar besiyeri kullanılır(19,26). Zon çapları ve sınır değer (breakpoint) ölçüleri NCCLS'in M2-A4 ve M7-A2 tablolarından bakılarak değerlendirilmeler yapılır.

Alternatif test yöntemleri

Çikolata Mueller-Hinton agarda disk diffüzyon yöntemi ile penisilin, tetrasiklin, spektinomisin ve sefoksitin için duyarlılık testleri yapılabilir(12). Özel katkılı GC agarda E-test ile MIC tayini yapılabilir(44).

NEISSERIA MENINGITIDIS

Son yıllara kadar *Neisseria meningitidis* izolatlarına duyarlılık testi yapılmasına gerek duyulmazdı. Meningokoksik infeksiyonların tedavisinde kullanılan penisilin, ampisilin, seftriakson,sefotaksim ve kloramfenikol bu suşlara etkili olduğu bilinen antibiyotiklerdir. Ancak İngiltere, İspanya, Güney Afrika ve Kanada gibi ülkelerden penisilin MIC değerleri 0.1 µg/ml üzerinde olan *N.meningitidis* suşları bildirilmiştir(7,25,43,46). Bu organizmanın beta-laktamaz yapan kökenleri de saptanmıştır(10). *N.meningitidis* suşlarında son yıllara ait bu değişiklikler doğrultusunda antibiyotik duyarlılık test yöntemleri geliştirilmiş ve önerilmiştir.

Koyun kanlı Mueller-Hinton agarda oksasilin (1 µg) diski etrafında 10 mm veya daha küçük zon çapı veya 2 U penisilin diski etrafında 26 mm veya daha küçük zon çapı penisiline direnci gösterebilir(8). Hugues ve ark.(20) *N.meningitidis* suşlarında agar dilüsyon yöntemi ile E-test sonuçlarını yedi antibiyotik kullanarak karşılaştırmışlar, her iki test arasında $\pm 1 \log_2$ dilüsyon uyumunu % 93 oranında bulmuşlardır. Buna göre E-test sonuçları referans agar dilüsyon yöntemi ile iyi bir korelasyon göstermektedir.

SONUÇ

Güç üreyen bakteriler dünyanın birçok yerinde son yıllara gelinceye kadar göstermedikleri birtakım direnç profillerine sahip olmuşlardır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının, bu suşlar izole edildiğinde, belli antibiyotik duyarlılık stratejilerine sahip olmalarında yarar vardır. Bu bakterilerle ilgili standardize edilmeye çalışılan duyarlılık yöntemleri henüz yenidir ve bazı problemleri de beraberinde taşımaktadır. Günümüzdeki yöntemlerde standardizasyonla ilgili ak-sayan taraflar olsa da, yapılan değişiklikler ve yeni üretilen bilgiler klinik mikrobiyologlarca yakından izlenmeli ve buna göre elde edilen duyarlılık verileri klinisyenlere ulaştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1- Appelbaum PC: Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An overview, *Clin Infect Dis* 15:77 (1992).
- 2- Baquero F: Evolution de la résistance du pneumocoque aux béta-lactamines en Espagne: un modele prédictif, *Méd Mal Infect* 24:241 (1994).
- 3- Barry AL, Packer RR: Performance of *Haemophilus* test media prepared with 12 different lots of Mueller-Hinton agar from four manufacturers, *J Clin Microbiol* 30:1145 (1992).
- 4- Barry AL, Pfaller MA, Fuchs PC: *Haemophilus* test medium versus Mueller-Hinton broth with lysed horse blood for antimicrobial susceptibility testing of four bacterial species, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:548 (1993).
- 5- Barry AL, Pfaller MA, Fuchs PC, Packer RR: In vitro activities of 12 orally administered antimicrobial agents against four species of bacterial respiratory pathogens from U.S. medical centers in 1992 and 1993, *Antimicrob Agents Chemother* 38:2419 (1994).
- 6- Bolmström A, Arvidson S, Ericsson M, Kalsson A: A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms, *28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Abstract No.1209, Los Angeles (1988).

- 7- Botha P: Penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Southern Africa, *Lancet* *i*:54 (1988).
- 8- Campos J, Trujillo G, Seuba T, Rodriguez A: Discriminative criteria for *Neisseria meningitidis* isolates that are moderately susceptible to penicillin and ampicillin, *Antimicrob Agents Chemother* *36*:1028 (1992).
- 9- D'Amato RF, Swenson JM, McKinley GA, Hochstein L, Wallman AA, Cleri DJ, Mastellone AJ, Fredericks L, Gonzales L, Pincus DH, Thornsberry C: Quantitative antimicrobial susceptibility test for *Streptococcus pneumoniae* using inoculum supplemented with whole defibrinated sheep blood, *J Clin Microbiol* *25*:1753 (1987).
- 10- Dillon JR, Pauzé M, Yeung KH: Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to *Neisseria meningitidis*, *Lancet* *i*:779 (1983).
- 11- Doern GV: In vitro susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*: review of new National Committee for Clinical Laboratory Standards recommendations, *J Clin Microbiol* *30*:3035 (1992).
- 12- Doern GV: Susceptibility tests of fastidious bacteria, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s.1342, ASM Press, Washington (1995).
- 13- Friedland IR, Shelton S, McCracken GH Jr.: Screening for cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* with the Kirby - Bauer disk susceptibility test, *J Clin Microbiol* *31*:1619 (1993).
- 14- Goldstein FV, Kitzis MD, Acar JF: Screening for extended-spectrum cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *6th International Congress for Infectious Diseases*, Abstract PCS 34, Prague (1994).
- 15- Gür D, Şener B, Sümerkan B, Koç N, Ünal S: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ve *Streptococcus pneumoniae*'ye karşı çeşitli antibiyotiklerin in-vitro etkinliği, *ANKEM Derg* *9*:115 (1995).
- 16- Gür D, Tunçkanat F, Şener B, Kanra G, Akalın HE: Penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Turkey, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* *13*:440 (1994).
- 17- Hakenbeck R, Tarpay M, Tomasz A: Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob Agents Chemother* *17*:364 (1980).
- 18- Heelan JS, Chesney D, Guadagno G: Investigation of ampicillin-intermediate strains of *Haemophilus influenzae* by using the disk diffusion procedure and current National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines, *J Clin Microbiol* *30*:1674 (1992).
- 19- Hindler J, Hochstein L, Howell A: Preparation of routine media and reagents used in antimicrobial susceptibility testing, "Isenberg HD (ed): *Clinical Microbiology Procedures Handbook* , 1. Cilt" kitabında s.5.19, Am Soc Microbiol, Washington (1992).
- 20- Hugues JH, Biedenbach DJ, Erwin ME, Jones RN: E test as susceptibility test and epidemiological tool for evaluation of *Neisseria meningitidis* isolates, *J Clin Microbiol* *31*:3255 (1993).
- 21- Jacobs MR, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Bolmström A: Evaluation of the E-test for susceptibility testing of pneumococci, *Diagn Microbiol Infect Dis* *15*:473 (1992).
- 22- Jetté LP, Ringuette L, Dascal A, Lapointe J, Turgeon P: Pneumococcal resistance to antimicrobial agents in the province of Quebec, Canada, *J Clin Microbiol* *32*:2572 (1994).
- 23- Jhonson AP, Warner M, George RC, Boswell TC, Fraise AP, Manek N: Oxacillin-resistant pneumococci sensitive to penicillin, *Lancet* *i*:1222 (1993).
- 24- John CC: Treatment failure with use of a third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: Case report and review, *Clin Infect Dis* *18*:188 (1994).
- 25- Jones DM, Sutcliffe EM: Meningococci with reduced susceptibility to penicillin, *Lancet* *i*:863 (1990).
- 26- Jones RN, Gavan TL, Thornsberry C, Fuchs PC, Gerlach EH, Knapp JS, Murray P, Washington II JA: Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility tests for *Neisseria gonorrhoeae*: interpretive criteria and quality control guidelines for ceftriaxone, penicillin, spectinomycin, and tetracycline, *J Clin Microbiol* *27*:2758 (1989).
- 27- Jorgenson JH: Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*, *Clin Infect Dis* *14*:119 (1992).
- 28- Jorgensen JH, Doern GV, Ferraro MJ, Knapp CC, Swenson JM, Washington JA: Multicenter evaluation of the use of *Haemophilus* test medium for broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* and development of quality control limits, *J Clin Microbiol* *30*:961 (1992).

- 29- Jorgensen JH, Ferraro MJ, McElmeel ML, Spargo J, Swenson JM, Tenover FC: Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporin resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates by use of E test, *J Clin Microbiol* 32:159 (1994).
- 30- Jorgensen JH, Howell AW, Maher HA: Quantitative antimicrobial testing for *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* by using E test, *J Clin Microbiol* 29:109 (1991).
- 31- Jorgensen JH, Maher LA, Howell AW: Use of *Haemophilus* test medium for broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*, *J Clin Microbiol* 28:430 (1990).
- 32- Jorgensen JH, Swenson JM, Tenover FC, Ferraro MJ, Hindler JA, Murray PR: Development of interpretive criteria and quality control limits for broth microdilution and disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*, *J Clin Microbiol* 32:2448 (1994).
- 33- Klugman KP: Pneumococcal resistance to antibiotic, *Clin Microbiol Rev* 3:171 (1990).
- 34- Klugman KP, Koornhof HJ: Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979-1986, *J Infect Dis* 158:956 (1988).
- 35- Küçükkaaraşlan A, Kocabeyoğlu Ö, Emekdaş G: Klinik örneklerden *Haemophilus cinsi* bakterilerin izolasyon sıklığı ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması, *İnfeksiyon Derg* 6:87 (1992).
- 36- Lopardo HA, Lovadina L, Rubeglio EA: More about cefuroxime screening test for pneumococci, *J Clin Microbiol* 33:1044 (1995).
- 37- Macias EA, Mason EO Jr, Ocera HY, LaRocco MT: Comparison of E test with standard broth microdilution for determining antibiotic susceptibilities of penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*, *J Clin Microbiol* 32:430 (1994).
- 38- Marton A, Gulyas M, Munoz R, Tomasz A: Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary, *J Infect Dis* 163:542 (1991).
- 39- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 4th ed. *Approved Standard M2-A4*, Villanova (1990).
- 40- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 2nd ed., *Approved Standard M7-A2*, Villanova (1990).
- 41- Öngen B, Kaygusuz A, Özalp M, Gürler N, Töreci K: İstanbul'da çocukluk yaş gruplarında *Streptococcus pneumoniae* suşlarında penisilin direnci aranması, *ANKEM Derg* 8:90 (1994).
- 42- Pankuch GA, Jacobs MR, Appelbaum PC: Study of comparative antipneumococcal activities of penicillin G, RP 59500, erythromycin, sparfloxacin, ciprofloxacin, and vancomycin by using time kill methodology, *Antimicrob Agents Chemother* 38:2065 (1994).
- 43- Saez-Nieto JA, Lujan R, Berron S, Campos J, Vinas M, Fuste C, Vazquez JA, Zhang Q, Bowler LD, Martinez-Suarez JV, Spratt BG: Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: A 5-year history (1985-1989), *Clin Infect Dis* 14:394 (1992).
- 44- Sanches ML, Barrett MS, Jones RN: The E-test applied to susceptibility tests of gonococci, multiply-resistant enterococci, and Enterobacteriaceae producing potent beta-lactamases, *Diagn Microbiol Infect Dis* 15:459 (1992).
- 45- Scriber SR, Low DE, Simor AE, Toye B, McGeer A, Jaeger R, and Canadian *Haemophilus* Study Group: Broth microdilution testing of *Haemophilus influenzae* with *Haemophilus* test medium versus lysed horse blood broth, *J Clin Microbiol* 30:2284 (1992).
- 46- Sutcliffe EM, Jones DM, El-Sheikh S, Percival A: Penicillin-insensitive meningococci in the UK, *Lancet* i:657 (1988).
- 47- Sümerkan B, Aygen B, Doğanay M: Résistance à la pénicilline G de *Streptococcus pneumoniae* en Turquie, *Méd Mal Infect* 25:1219 (1995).
- 48- Tan TQ, Shutze GE, Mason EO Jr, Kaplan SL: Antibiotic therapy and acute outcome of meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* considered intermediately susceptible to broad-spectrum cephalosporins, *Antimicrob Agents Chemother* 38:918 (1994).
- 49- Tenover FC, Swenson JM, McDougal LK: Screening for extended spectrum cephalosporin resistance in pneumococci, *Lancet* i:1420 (1992).
- 50- Wallace RJ Jr, Nash RD, Steingrube VA: Antibiotic susceptibilities and drug resistance in *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*, *Am J Med* 88: S46 (1990).