

ANAEROP BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

Ferda TUNÇKANAT

Önemli patojenler olan anaerop bakterilerin duyarlılık testleri ayrı bir önem taşımaktadır. Çünkü anaeroplarda direnç sorunu giderek artmaktadır (1,13). Ayrıca anaerop bakterilerin özel üreme gereksinimleri ve üreme hızlarının yavaş olması nedeniyle kullanılan testlerin bazı özellikler göstermesi gerekir. Bu ise anaerop duyarlılık testlerinde tartışmalı bir durum yaratmakta ve bazı standardizasyon zorluklarını beraberinde getirmektedir. Öte yandan anaerop bakteriler genellikle çeşitli anaerop ve fakültatif bakterilerin birlikte katıldığı mikst infeksiyonlar oluştururlar. Bu etkenlerin saf kültür halinde izole edilmesi, identifikasyonu ve çeşitli antimikrobik ajanlara duyarlılıklarının saptanması zaman ve çaba gerektirir (7). Testlerin uygulanması ile ilgili zorluklar da göz önüne alındığında, anaerop infeksiyonlarda, etken bakterilerin duyarlılıklarının rutin olarak test edilmesi her zaman mümkün olmamakta ve yalnızca bazı durumlarda bu testlerin uygulanması önerilmektedir (5,7).

Anaerop duyarlılık testleri uygulama endikasyonları

Anaerop duyarlılık testlerinin uygulanma endikasyonları şu şekilde belirlenmiştir (11):

1. Anaerop bakterilerin yeni antimikrobik ajanlara duyarlılıklarının saptanması,
2. Yeryüzündeki belirli merkezlerde, anaerop duyarlılık paternlerinin belirli aralıklarla saptanarak izlenmesi,
3. Bölgesel olarak çeşitli hastanelerde anaerop duyarlılık paternlerinin belirli aralıklarla saptanarak izlenmesi,
4. Seçilmiş hastalarda tedaviye yardımcı olmak amacı ile etken bakterilerin duyarlılıklarının saptanması.

Duyarlılık testlerinin uygulanmasını gerektiren infeksiyonlar, ağır ve hayatı tehdit edici infeksiyonlar (beyin absesi, bakteriyemi, endokardit gibi), ampirik tedavi konusunda karar verilemeyen durumlar, ampirik tedaviye yanıt vermeyen ya da başlangıçta tedaviye yanıt verdiği halde daha sonra relaps gösteren olgular, antimikrobik tedavinin esas olarak rol oynadığı infeksiyonlar ile uzun süreli tedavi gerektiren durumlar (osteomyelit, septik artirit, greft ve protez infeksiyonları gibi) olarak belirlenmiştir. Etken bakteriler açısından bakıldığında ise duyarlılık testlerinin özellikle uygulanması gereken anaerop bakteriler, duyarlılık durumları değişkenlik gösteren bakteriler (*Bacteroides fragilis* grubu, diğer anaerop Gram negatif çomaklar, bazı *Clostridium* türleri gibi), duyarlılık paternleri çok iyi bilinmeyen bakteriler, yüksek virulanslı bakteriler ve saf kültür halinde izole edilen bakterilerdir (7).

Anaerop duyarlılık testleri

Anaerop bakterilerin antimikrobik ajanlara duyarlılıklarının saptanması amacı ile çeşitli testler kullanılmıştır. Bunlar:

1. Disk difüzyon yöntemi,
2. Tüpte disk elüsyon yöntemi,
3. Mikrodilüsyon yöntemi,

4. Tüp dilüsyon yöntemi,
5. Agar dilüsyon yöntemi (Referans test),
6. Sınırlı agar dilüsyon yöntemi,
7. Beta-laktamaz testi,
8. E-test,
9. Spiral gradient yöntemi.

Bunlardan disk difüzyon ve tüpte disk elüsyon yöntemleri birçok antibiyotik için "National Committee for Clinical Laboratory Standards"ın (NCCLS) (11) referans test olarak önerdiği agar dilüsyon yöntemi ile uyumlu sonuçlar vermediğinden artık kullanılması önerilmeyen testlerdir. İlaç konsantrasyon gradient yöntemleri olarak bilinen E-test ve spiral gradient yöntemi ise doğru ve güvenilir sonuçlar veren pratik ve oldukça yeni yöntemler olmakla birlikte, ticari ürün ve gereçlerin kullanımını gerektiren pahalı testler oldukları için NCCLS önerileri arasında yer almamaktadır.

Mikrodilüsyon yöntemi:

Kolay uygulanabilir, pratik ve ekonomik bir test olması nedeniyle rutin kullanıma uygundur. Diğer uygulamalarında olduğu gibi mikroplak çukurlarında uygun bir besiyeri kullanılarak (Schaedler, *Brucella*, West-Wilkins, brain-heart infüzyon, Wilkins-Chalgren sıvı besiyerleri) antimikrobik ilacın seri sulandırımı hazırlanır. Testin uygulanması sırasında her çukurda en az 100 µl hacimde sıvı bulunmasına özen gösterilmelidir. Bu, uzun inkübasyon sonucunda oluşacak buharlaşmanın ve dolayısıyla ilacın konsantrasyonundaki görece artışın engellenmesi açısından gereklidir. Ayrıca daha küçük hacimlerde inokulum etkisi daha fazla olmaktadır. Anaerop mikrodilüsyon testinde inokulum miktarı da özellikle önemlidir; bundaki küçük oynamalar bile sonucu önemli ölçüde etkiler. İnokulum yaklaşık 1×10^6 CFU/ml (her çukurda 1×10^5 CFU) olacak şekilde ayarlanmalıdır.

Hazırlanan mikroplaklar, anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar okunur. Normal koşullarda sonuçlar kolayca değerlendirilebilir. Ancak bazen belirgin bir üreme inhibisyonunu takiben hafif bir üreme devam edebilir. Bu durum bazı besiyeri-ilaç ya da bakteri-ilaç kombinasyonlarında görülür. Böyle durumlarda üremenin belirgin olarak inhibe olduğu konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilir. Bunun dışında, mikrodilüsyon testinde kullanılan besiyerlerinde bazı nazlı anaeroplara üreyememesi bir diğer sorundur.

Tüp dilüsyon yöntemi:

NCCLS önerileri arasında yer almakla birlikte yaygın olarak kullanılmayan bir yöntemdir. Az sayıda izolatin test edileceği durumlarda ya da *Clostridium* türleri gibi besiyeri yüzeyinde yayılım gösteren bakterilerin duyarlılıklarının saptanmasında kullanılabilir. Keza ilacın minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerinin saptanmasında da bu yöntem tercih edilmelidir.

Agar dilüsyon (Wadsworth) yöntemi:

NCCLS'in referans test olarak önerdiği yöntemdir. Uygulaması zahmetli ve nispeten pahalı bir test olduğu için rutin kullanıma çok uygun değildir. Diğer test yöntemlerinin, çeşitli besiyerlerinin ve yeni antimikrobik ilaçların etkilerinin araştırılmasında kullanılır. Bu yöntemde kullanılması önerilen besiyeri *Brucella* kanlı agardır (5 µg/ml hemin ve 1 µg/ml vitamin K₁ eklenmiş). Hemin ve vitamin K₁ sterilizasyondan önce besiyerine katılabilir. Hazırlanan besiyeri hemen kullanılabilmesi gibi, belirli hacimlerde kapaklı tüplere dağıtılarak bir ay kadar saklanabilir. Testin uygulanacağı gün kullanılacak ilaç sulandırımı kadar sayıda besiyeri eritilir. Besiyerleri 50°C'ye soğutulduğunda her bir tüp içine % 5 oranında defibrine veya dondurulmuş çözülmüş (laked) koyun kanı ve seri sulandırımı yapılmış anti-

biyotik solüsyonundan 1/10 oranında eklenerek iyice karıştırılıp petrilere dökülür. Besiyerleri kapak hafif açık olacak şekilde 37°C'de 30-45 dakika tutularak kurutulur. Bu şekilde hazırlanan antibiyotikli besiyerleri sıkıca kapatılmış plastik torbalarda 4°-10°C'de en fazla bir hafta saklanabilir. Eğer test araştırma amacı ile uygulanıyorsa bu süre üç günü geçmemelidir. İmipenem içeren plakların hazırlandıkları gün kullanılmaları gerekir.

İnokülasyon için en düşük antibiyotik konsantrasyonu içeren plaktan başlanır. Uygun bir replikator yardımı ile belli hacimde bakteri süspansiyonu tüm plaklara ekilir. İnokulum her ekim alanında 1×10^5 CFU olacak şekilde ayarlanmalıdır. Her uygulamada test bakterileri antibiyotik içermeyen iki ayrı plağa ekilerek biri üreme kontrolü için anaerop, diğeri ise kontaminasyon kontrolü için aerop ortamda inkübe edilir. Ayrıca ekili bir diğer plak ise kurumuş inokulumu hafif üremeden ayırt etmek amacıyla 4°C'de bekletilir (inokulum kontrolü).

Bakteri ekimi tamamlanuncaya kadar olan işlemlerin anaerop ortamda yapılması gerekli değildir (ancak bazı nazlı anaeroplara için kullanılacak besiyerlerinin önceden anaerop ortamda tutularak indirgenmesi gerekebilir). Anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübasyonu takiben koyu, ışığı yansıtmayan bir zemin üzerinde sonuçlar okunur. Kontrol üreme ile karşılaştırıldığında üremenin belirgin olarak değişiklik gösterdiği dilüsyon MİK değerini verir. Üremede gözlenen belirgin değişiklik, hiç üreme olmaması ya da çok hafif bir üreme, sisli bir görünüm, çok sayıda minik koloniler veya bir-iki tane normal büyüklükte koloni görülmesidir (11).

Sınırlı agar dilüsyon yöntemi:

Agar dilüsyon yönteminin klinik kullanıma uygun ve daha ekonomik olacak şekilde sınırlı olarak uygulandığı bir testtir (8). Her antibiyotüğün 1-4 konsantrasyonu bölmeli plaklar kullanılmak suretiyle aynı plakta çalışılabilir. Bu amaçla örneğin 2 bölmeli plak kullanılarak 16 bakteriye kadar bakterinin 12 farklı ilaca duyarlılık testi tek bir anaerop kavanoza sığdırılabilir. Kullanılan besiyeri, testin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi referans testteki gibidir. Sınırlı agar dilüsyon testinde dirençli bakterileri saptayabilmek için NCCLS'de duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak belirtilen sınır değerlerden en yüksek olanını teste dahil etmek gerekir.

Dilüsyon testlerinde kullanılan inokulumun hazırlanması:

Anaerop bakterilerin *Brucella* kanlı agardaki en az 24 saatlik kültüründen 3 mm çapında bir öze dolusu, ya da 5-6 koloni, indikatörsüz zengin tiyoglikolat (5 µg/ml hemin, 1 µg/ml vit K₁, 1 mg/ml NaHCO₃ içeren) besiyerine ekilir ve yeterli bulanıklık oluşuncaya kadar 6-24 saat inkübe edilir. Bazı nazlı anaeroplara için en az 24 saatlik katı besiyeri kültüründen *Brucella* sıvı besiyeri içinde doğrudan ayarlama yapılabilir (0.5 McFarland standardına uygun). Koloniler 72 saatten eski olmamalı ve 30 dakikadan daha uzun bir süre aerop ortamda kalmamış olmalıdır.

İnokulum ile ilgili sorunlar:

Anaerop bakterilerin şekil ve büyüklükleri belirgin farklılık gösterdiği için bulanıklık standardı kullanmak her zaman uygun olmayabilir. Örneğin aynı bulanıklıkta *Clostridium* gibi büyük bakterilerin sayısı ile peptostreptokoklar gibi daha küçük anaeroplara sayıları arasında önemli farklar bulunur (2). Bu nedenle referans test sırasında kantitatif dilüsyon işlemlerinin uygulanması gerekebilir. Ancak klinik laboratuvarlarda en pratik yöntem kuşkusuz bulanıklık standardının kullanılmasıdır.

Kontrol bakteriler:

Bacteroides fragilis ATCC 25285,

Bacteroides thetaiotamicron ATCC 29741,

Eubacterium lentum ATCC 43055.

Bunlardan en az ikisi agar dilüsyon yönteminde kontrol olarak kullanılmalıdır. *Clostridium perfringens* ATCC 13124 suşunun kontrol olarak kullanılması artık önerilmemektedir (11).

Beta-laktamaz testi:

Kromojenik sefalosporin (nitrosefin) yöntemi ile beta-laktamaz aktivitesine bakılması, belirli anaerob bakterilerin bazı beta-laktam ilaçlara direncini saptamak amacı ile tarama testi olarak kullanılabilir (11). Basit ve hızlı bir testtir. Ancak kullanımı sınırlıdır ve duyarlılık testleri yerine değil, onları desteklemek amacı ile kullanılmalıdır (18). Beta-laktamaz testi ile saptanan negatif bir sonuç, her zaman bakterinin o ilaca duyarlı olduğunu göstermeyebilir. Bazı beta-laktam ilaçlar bakterinin yapmış olduğu beta-laktamazlara dirençli olabilir. Ayrıca bu test imipenem ve sefoksitin gibi ilaçların hidrolizini yeterince göstermeyebilir. Dahası anaeroplarda beta-laktam direnci her zaman beta-laktamaz yapımına bağlı olmayabilir (6). Ancak pozitif bir sonuç her zaman penisilin G ve ampisilin direncini göstermesi açısından önem taşır (7).

E-test:

Son yıllarda geliştirilmiş olan E-test (AB, Biodisk, Solna, İsveç) disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemlerinin bir arada uygulanması esasına dayanan bir testtir (3). E-test ile yapılan çeşitli araştırma sonuçları referans agar dilüsyon test ile gayet uyumlu sonuçlar vermektedir (3,4,10). Pratik ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle rutin kullanıma çok uygundur. En önemli dezavantajı pahalı bir test olmasıdır. Bu yöntemde ilaç konsantrasyonları gradient oluşturacak biçimde, ince plastik bir şeridin bir yüzeyine bir polimer yardımı ile tespit edilmiştir. Diğer yüzeyde ise rakamlar bulunur. Bakteri, disk difüzyon testinde olduğu gibi besiyeri yüzeyine ekildikten sonra, E-test şeritleri radyal olarak besiyerine yerleştirilir. Anaerob ortamda 37°C'de 48 saat inkübasyonu takiben sonuç okunur. Bu süre sonunda şerit etrafında, antibiyotik gradienti nedeni ile damla şeklinde bir inhibisyon zonu oluşur. Zonun şerit ile kesiştiği nokta MİK değeri olarak belirlenir.

Spiral gradient yöntemi:

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki "Spiral Gradient Instruments" (Bethesda, Md.) tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir (9). "Spiral plater" (Spiral Biotech, Bethesda, Md.) adı verilen bir alet yardımı ile uygulanır. Spiral plater 20 yıldan fazla bir süredir kullanılan ve bakteri sayımı için geliştirilmiş bir alettir. 1990 yılından bu yana ise spiral gradient yöntemi ile antibiyotiklerin MİK değerini saptamak amacı ile kullanılmaktadır (9,15,17).

Alet belli miktarda antibiyotik stok solüsyonunu spiral düzende besiyeri yüzeyine bırakarak merkezden çevreye doğru azalan bir ilaç konsantrasyon gradienti oluşturmaktadır. Besiyerleri ilacın difüzyonu için 4-6 saat (15) anaerob ortamda bekletildikten sonra, bulaıklığı 0.5 Mc Farland standardına uygun olacak şekilde hazırlanan bakteriler radyal inokülatör yardımı ile besiyeri yüzeyine radyal çizgiler oluşturacak şekilde ekilir. Böylece 15 farklı bakteri aynı test plağına ekilebilir (15). Plaklar anaerob ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar değerlendirilir. Bunun için çizgi şeklinde üremiş bakterilerin üremelerinin sona erdiği nokta ile merkez arasındaki mesafe ölçülür (tail ending radius=TER). Bazı durumlarda üreme çizgisi belirgin bir şekilde sona ermeyip, agar dilüsyon-

da görülebilen sisli üremeyi andırır, hafif bir üreme gözlenebilir. Bu durumda üremenin belirgin olarak şekil değiştirdiği nokta ile merkez arasındaki mesafe (tail beginning radius=TBR) ölçülür. Bazen üreme çizgisi dışında, bu üremeden ayrı gibi duran koloniler (outliers) oluşabilir. Bunlar hesaba katılmaz (15,17).

Bu şekilde saptanan ölçümler üretici firmanın sağladığı bilgisayar programına girilir. Bu program ile ilacın molekül ağırlığı ve difüzyon özellikleri de kullanılarak, yapılan ölçüme karşılık gelen ilaç konsantrasyonu (minimum aktivite konsantrasyonu=MAK) saptanır. MİK değeri ise MAK değerine eşit ya da ona en yakın olan en yüksek çift kat dilüsyondur (17). Örneğin MAK değeri 3.2 µg/ml ise MİK değeri 4 µg/ml olarak alınır. TER ve TBR farklı ise MAK için TBR değeri kullanılır.

Anaerop duyarlılık testlerinde karşılaşılan sorunlar

Bugün NCCLS'in ya da başka grupların önermiş oldukları anaerop duyarlılık testleri çeşitli antimikrobik ajanların etkinliklerinin araştırılması ve anaeropların direnç paternlerinin elde edilerek ampirik tedavide yol gösterici olması açısından oldukça yeterli sonuçlar vermekle birlikte, bu konudaki sorunlar henüz tam olarak çözümlenmemiştir. Bu sorunları iki farklı açıdan değerlendirmek mümkündür: laboratuvar ve klinik.

Anaerop duyarlılık testleri ile ilgili laboratuvarda karşılaşılan sorunlar:

Test edilen bakterilerle ilgili sorunlar:

Bazı çalışmalarda çok az sayıda suş çalışılmış olması, bakteri identifikasyonlarının yetersiz ya da yanlış yapılması, *B. fragilis* grubu bakterilerde sonuçların tür ayırımı yapılmaksızın gruba genellenerek bildirilmesi, taksonomideki yeni değişikliklere uyulmaması, taze izolat yerine stok kültür kullanılması gibi pek çok sorun duyarlılık testleri ile ilgili sonuçları olumsuz olarak etkilemektedir.

Uygulama ile ilgili sorunlar:

Seçilen yöntemin ya da yöntemin uygulanma şeklinin (besiyeri, inokulum, inkübasyon.. v.b) standartlara uygun olmaması sonuçları önemli ölçüde etkilemektedir (12). Bunun yanı sıra kullanılan tekniğin kendisinden kaynaklanan bazı sorunlar da söz konusu olabilmektedir (mikrodilüsyon testinde bazı nazlı anaeropların ürememesi, agar dilüsyon yönteminde testin uygulanmasındaki zorluklar nedeniyle hata oranının yüksek olması, seftizoksimin in-vitro etkinliğinin mikrodilüsyon testinde agar dilüsyona göre daha fazla bulunması gibi) (14).

Sonuçların değerlendirilmesi ile ilgili sorunlar:

Bunlar arasında, MİK değerinin saptanması ile ilgili zorluklar ve ayrıca birçok anaerop için (özellikle *B. fragilis* grubu) MİK değerlerinin sınır değere yakın bulunması gibi sorunları saymak mümkündür. Böylece duyarlılık testleri için kabul edilir test hatası olan bir dilüsyon farkı test sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Örneğin bir antibiyotik için sınır MİK değer 16 µg/ml ise, kabul edilebilir test hatası olarak MİK değerinin bunun bir dilüsyon altında (8 µg/ml) ya da üstünde (32 µg/ml) bulunması sonucu önemli ölçüde etkileyecektir. Bir testte duyarlı bulunan bakteri, bir diğer testte dirençli olarak bulunacaktır. Bunların dışında farklı ülkelerde farklı sınır değerlerin kabul edilmesine ilişkin değişik bildiriler durumu daha da karışık hale getirmektedir (14,16). Bu konuyla ilgili bir diğer sorun da araştırma sonuçlarının bildirilmesindeki yetersizliktir. Sonuçlar genellikle MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri olarak bildirilmekte ve duyarlılık oranlarını tam olarak yansıtmamaktadır. Bu sorunun önüne geçebilmek için sonuçların sınır değer ve test edilen diğer konsantrasyonlardaki duyarlılık yüzdeleri şeklinde verilmesi gerekmektedir (11).

Anaerop duyarlılık testleriyle ilişkili olarak klinikte karşılaşılan sorunlar:

Anaerop duyarlılık test sonuçları anaerop infeksiyonlarda klinik ve bakteriyolojik gi-dişi belirlemede her zaman yeterli olmamaktadır. Bunun çeşitli nedenleri vardır. Her şey-den önce hasta, antibiyotik tedavisi olmadan cerrahi müdahale ile ya da cerrahi müdahale yapılmaksızın iyileşebilir, ya da uygun antibiyotik tedavisine rağmen gerekli cerrahi mü-dahale uygulanmadığı için tedaviye yanıt vermeyebilir. Ayrıca hastanın genel durumu da (yaş, beslenme durumu, altta yatan hastalık... vb) tedaviye yanıtı önemli ölçüde etkiler. Bu-nun dışında antimikrobiyal tedavinin kendisi ile ilgili bazı faktörler de (tedaviye başlama zamanı, infeksiyon bölgesinde sağlanan ilaç düzeyi, bakterisidal aktivitenin sağlanıp sağ-lanamaması, ilacın düşük Eh ve pH'daki etkinliği, mikrobiyal enzimlerle inaktive olup ol-madığı... vb) tedaviye yanıtta çok önemlidir (7).

Benzer şekilde bakteriyolojik yanıt da çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. İnfeksiyon bölgesinde etken olan tüm suşlar izole edilememiş ya da tanımlanamamış olabilir. Ancak mikst infeksiyonlarda bulunan çeşitli mikroorganizmaların infeksiyonda taşıdığı önem de-recesini belirlemek güçtür. Bu nedenle infekte eden floranın kantitasyonu önemlidir. Bü-tün bunlara rağmen anaerop infeksiyonların tedavisinde, etken mikroorganizmaların tümü-nün ortadan kaldırılmasının şart olmayışı, bakteri sayısının azaltılması ve metabolizması-nın değiştirilmesinin yeterli oluşu klinikçiye tedavide destek sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Aldrige KE: The occurrence, virulence and antimicrobial resistance of anaerobes in polymicrobi-al infections, *Am J Surg* 169 (Suppl 5A): 2 (1995).
- 2- Aldrige KE, Schiro DD: Slight differences in inoculum size can make a difference in minimum inhibitory concentrations, *Diagn Microbiol Infect Dis* 18: 191 (1994).
- 3- Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C: Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special chal-lenge set of bacteria, *J Clin Microbiol* 29: 533 (1991).
- 4- Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ: Evaluation of the E test for susceptibility tes-ting of anaerobic bacteria, *J Clin Microbiol* 29: 2197 (1991).
- 5- Finegold SM: Anaerobes: Problems and controversies in bacteriology, infections and susceptibi- lity testing, *Rev Infect Dis* 12 (Suppl 2): 223 (1990).
- 6- Finegold SM: Clinical relevance of antimicrobial susceptibility testing, *Eur J Clin Microbiol In- fect Dis* 11: 1021 (1992).
- 7- Finegold SM: Perspective on susceptibility testing of anaerobic bacteria, *Clin Infect Dis* 25 (Suppl 2): 251 (1997).
- 8- Hauser KJ, Johnston JA, Zabransky RJ: Economical agar dilution procedure for susceptibility tes-ting of anaerobes, *Antimicrob Agents Chemother* 7: 712 (1975).
- 9- Hill GB, Schalkowsky S: Development and evaluation of the spiral gradient endpoint method for susceptibility testing of anaerobic Gram negative bacilli, *Rev Infect Dis* 12 (Suppl 2): 200 (1990).
- 10- Nachnani S, Scuteri A, Newman MG, Avanesian AB, Lomeli SL: E test: a new technique for an- timicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms, *J Periodontol* 12 (Suppl 1): 210 (1992).
- 11- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*, 4th ed, Approved standard M 11-A4, National Committee for Cli- nical Laboratory Standards, Villanova, Pa (1997).

- 12- Ollson-Liljequist B, Nord CE: Methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria, *Clin Infect Dis* 18 (Suppl 4): 293 (1994).
- 13- Rasmussen BA, Bush K, Tally FP: Antimicrobial resistance in anaerobes, *Clin Infect Dis* 24 (Suppl 1): 110 (1997).
- 14- Wexler HM: Susceptibility testing of anaerobic bacteria -the state of the art, *Clin Infect Dis* 16 (Suppl 4): 328 (1993).
- 15- Wexler HM, Molitoris E, Jashnian F, Finegold SM: Comparison of spiral gradient and conventional agar dilution for susceptibility testing of anaerobic bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1196 (1991).
- 16- Wexler HM, Molitoris E, Molitoris D: Susceptibility testing of anaerobes: old problems, new options? *Clin Infect Dis* 25 (Suppl 2): 275 (1997).
- 17- Wexler HM, Molitoris E, Murray PR, Washington J, Zabransky RJ, Edelstein PM, Finegold SM: Comparison of spiral gradient endpoint and agar dilution methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria: a multilaboratory collaborative evaluation, *J Clin Microbiol* 34: 170 (1996).
- 18- Zabransky RJ: Review of methods for susceptibility testing of anaerobes, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 1025 (1992).