

**CLOSTRIDIUM WELCHII TİP A'NIN ANTİBİYOTİKLERE
DUYARLILIĞINDA ÇEŞİTLİ ANTİBİYOGRAF
TEKNİKLERİNİN DENENMESİ VE ÜLKEMİZ TEŞHİS
LABORATUVARLARINDA KULLANILABİLECEK EN UYGUN
ANTİBİYOGRAF YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ (*)**

**"The Antimicrobial Susceptibility Testing of *Cl. welchii* Type
A with Different Methods and Determination of a Suitable
Method Applicable to Diagnostic Laboratories"**

Fatma UYANIK (**)

Clostridium'lar doğada çok yaygın olarak bulunan anaerob veya mikroaerofil basillerdir. Oksijen bulunan ortamlarda üremezler ve genellikle Gram pozitif boyanırlar (4, 27, 33). Bunların çoğu, proteinleri dekompoze eder veya toksin oluşturur, bazıları ise her iki özelliğe de sahiptir. İnsan ve hayvanların bağırsaklarında ve toprakta yaygın olarak bulunurlar (4, 37).

Cl. welchii (*perfringens*) suşları sporlu, küçük ve kalın çomaklar şeklinde, hareketsiz, kapsüllü, 4-8x1-2 mikron boyutlarında basillerdir. *Cl. welchii* anaerob koşullarda adi laboratuvar besiyerlerinde çabuk ürer. Diğer anaerob etkenler kadar tam bir anaerob ortama ihtiyaç göstermez, az miktarda oksijen içeren ortamlarda da üreyebilir. Alkali ortamlarda ise bol miktarda gaz oluşturarak hızla ürer. Sıvı besiyerlerinde ekzotoksin oluşturur (3, 27, 39).

Du Preez ve ark. (19), Holdeman ve ark.'na atfen sağlıklı dokularda oksido-redüksiyon (rodoks) potansiyelinin + 120 milivolt (mV) civarında olduğunu, anaerobik mikroorganizmaların çoğunun ise en iyi -150 mV'un altındaki değerlerde ürediklerini bildirmiştir.

* Uzmanlık tezinden özetlenmiştir.

** Vet. Hek., Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü

Aynı araştırıcılar (19), Finegold ve ark.'na atfen aerob, mikroaerofil veya fakültatif organizmalar tarafından oluşturulan primer infeksiyonun sebep olduğu doku nekrozu, apse ve gaz oluşumu nedeni ile bölgeye kan sağlanması engellenerek redoks potansiyelinin düştüğünü belirtmiştir. Ayrıca dokuların redoks potansiyelinin düşmesine neden olan predispoze faktörlerin varlığında da sporsuz, obligat anaerobların karıştığı sekonder infeksiyonların görüldüğu bildirilmiştir (19).

CI. welchii tip A, CI. novyi tip A (CI. oedematiens) ve CI. septicum gazlı gangren (Klostridial myositis) olaylarında en sık rastlanan etkenlerdir (4, 27, 33, 35). Bunların yanısıra CI. bifermetans, CI. histolyticum, CI. romasum, CI. sporogenes ve diğer anaerobik klostridial sporlu etkenler de gazlı gangren olaylarına katılmaktadır. CI. welchii'nin diğer patojen etkenlere kıyasla doğada daha yaygın olarak bulunduğu (48), Birinci Dünya Savaşında harp yarası infeksiyonu olarak önem kazanan gazlı gangren olgularının %75'inde etkenin CI. welchii olduğu bildirilmiştir (4). Gazlı gangren, yaraların spor kapsayan fekal bir materyal veya toprakla kontaminasyonu sonucu şekillenir. Etken yara bölgesinde çoğalarak dokulardaki karbonhidratları fermente eder ve gaz oluşturur. Nekroze edici toksin ve hyaluronidaz enziminin sekresyonu ile birlikte kan akımı ile ilişkili olarak dokunun şişmesi infeksiyonun yayılmasını kolaylaştırır. Doku nekrozu genişledikçe bakteriyel üreme de giderek artar. Sonuçta hemolitik anemi, şiddetli bir toksemi ve ölüm şekillenir (33). Gazlı gangren olaylarında miks infeksiyonlar kaçınılmazdır. Miks infeksiyonlarda toksijenik ve proteolitik Clostridium'lara ek olarak çeşitli koklar ve Gram negatif organizmalar da infeksiyona katılmaktadır (19, 23). Kadınların % 5'inin genital sisteminde CI. perfringens saptandığı, müdahaleli abortusları takiben klostridial infeksiyonların şekillendiği ve neoplasmalı hastalarda klostridial bakteriyemilerin sıkça görüldüğu bildirilmektedir (33). Açık kemik kırıkları ve doğum sonrası uterus yaralarının kontamine olması halinde infeksiyonun 1-3 gün içinde yayıldığı ve deri altı dokularında ve adalelerde krepitasyon, pis kokulu bir akıntı, hızla gelişen nekroz, ateş, hemoliz, toksemi ve çok sonucu ölüm şekillendiği bildirilmiştir (33).

CI. welchii Tip A insanlarda toksik-infeksiyöz tipte gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır (4, 33, 35). CI. welchii Tip A'nın sporları ısıya duyarlı olan birinci alt tipinin gazlı gangren, sporları ısıya dayanıklı olan ikinci alt tipinin ise gıda zehirlenmelerine neden olduğu bildirilmektedir (35). CI. welchii Tip A, yara infeksiyonu, yeni doğan kuzularda hemolitik anemi, ikterus ve hemoglobinüri oluşturur, yetişkin koyun ve danalarda ise enterotoxemi'ye neden olur (4, 33, 42). Broilerlerde de nekrotik enteritis olgularından CI. welchii izole edildiği rapor edilmiştir (38).

Kemoterapötikler, vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyona bağlı olarak mikroorganizmalar üzerine bakterisid (öldürücü) ve bakteristatik (üremeyi durdurucu) etki yaparlar. Bakteristatik etkili antimikrobiyal maddeler bakteri hücrelerinin gelişimini ve üremesini önlerler bakteriyi doğrudan doğruya öldürmezler. Gelişme ve üremesi duran bakteriler vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolayca yok edilebilirler. Her kemoterapötik maddenin sağıtıcı dozlarda etkili olabildiği mikroorganizma cinslerinin hepsine bir-

den kemoterapötüğün etki spektrumu denir. Sınırlı sayıda mikroorganizma cinslerine etki eden antimikrobiyal maddelere dar spektrumlu, çok sayıda mikroorganizma cinsine etki edenlere ise geniş spektrumlu kemoterapötikler adı verilmektedir (3, 11, 36).

Antimikrobiyal maddeler mikroorganizmaların çeşitli işlev ve yapı maddeleri üzerine etki ederler. Antibiyotikler, bakterilerin hücre duvarı ve sitoplazmik membran sentezini inhibe etmek, protein sentezini engellemek, nükleik asit fonksiyonunu ve sentezini bozmak ve metabolik antagonistik etki yapmak suretiyle aktivite göstermektedirler (3, 5, 10, 11, 21).

Direnç, bakteri ve diğer mikroorganizmaların kemoterapötik maddelerden etkilenmemesi demektir. Antimikrobiyal maddelere karşı direçlilik çeşitli mekanizmalar ile oluşur. Antibiyotiklerin tahribi, bakteri hücre duvarının permeabilitesinin azalması, antibiyotikler kombine edildiklerinde ortaya çıkan kompetatif inhibisyon, mutasyon, ribozomlarda meydana gelen değişiklikler ve antagonist madde sentezi sonucunda antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmaktadır (1, 3, 10, 11, 15, 17, 21, 36).

Antibiyotikler profilaktik ve terapötik olarak kullanılmalarının yanısıra hayvanlarda yemden yararlanma gücünü arttırmak ve büyümeyi hızlandırmak amacı ile yem katkısı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (24, 38, 43, 52). Şanlı ve ark. (52), yumurtacı ve etçi piliçler ile yaptıkları bir çalışmada, oksitetrasiklin ve çinko basitrasin'e karşı dirençli E.coli suşlarının sayısında %3.1-100 arasında bir artış olduğunu saptamışlardır. Aydın ve ark. (6). tarafından broilerler ile yapılan bir başka çalışmada, antibiyotikli yemlerle beslenen hayvanlardan izole edilen E. coli suşlarından çoğunun çeşitli antibiyotiklere karşı dirençli bulunduğu bildirilmiştir.

Anaeroblarda antimikrobiyal duyarlılık spektrumunun kısmen stabil olduğu (50, 54) bildirilmekle birlikte penisilin ve diğer beta-laktam antibiyotiklere karşı beta-laktamaz ile ilişki bir dirençliliğin meydana geldiği bildirilmiştir (2). Finegold ve ark. (22) tarafından yapılan bir çalışma ile, Bacteroides fragilis suşlarının penisilin G'ye dirençli, diğer anaerobların ise genellikle duyarlı olduğu saptanmıştır. Bir başka çalışmada da (19), laktasyon dönemindeki ineklerdeki mastitis olaylarının %12'sinden anaerob mikroorganizmaların izole edildiği ve bu olaylardan izole edilen tüm Bacteroides fragilis suşlarının penisilin G ve tetrasiklin'e dirençli olduğu bildirilmektedir. Baba ve ark. (7), sığırlarda akciğer ve karaciğer apseleri ile caudal ve caval trombozis'e neden olan Fusobacterium necrophorum suşlarının penisilin ve sefalosporinler'e duyarlı olduklarını saptamışlardır. Salpingitis ve doğum sonrası endometritislerden izole edilen 40 anaerob mikroorganizmanın %62.5'inin, anaerobik infeksiyonların sağıtımında etkili olduğu bildirilen klindasin'e dirençli olduğu kaydedilmiştir (44). Bir çok araştırmacı tarafından (9, 45, 48, 49) yemlere antimikrobiyal maddelerin katılmasının antibiyotiklere dirençli CI. welchii suşlarının ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmektedir. Spico ve ark. (48), CI. welchii'nin tetrasikline karşı direnç kazandığını rapor etmişlerdir. Yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların direnç kazanması sonucunda yeni antibiyotiklerin denenmesi gündeme gelmektedir. Bu amaçla Kondo ve Tateyama (38) tarafından yapılan bir çalışmada yeni geliştirilmiş bir

gliko-peptid grubu antibiyotiğin, broilerlerde nekrotik enteritis olgularından izole edilen *Cl. welchii* suşları üzerinde aktif olduğu saptanmıştır. Appelbaum ve ark. (2) tarafından yapılan bir başka çalışmada beta-laktam halkası içeren antibiyotiklerin, beta-laktamaz inhibitörler ile kombine edildiğinde, beta-laktamaz üreten anaeroblara karşı mükemmel bir aktivite gösterdikleri ve özellikle miks infeksiyonlarda yararlı olabileceği bildirilmektedir.

Ortamın pH'sı, kullanılan besiyeri ve besiyerine katılan maddeler, ilacın stabilitesi, inokulumun büyüklüğü ve mikroorganizmanın metabolik aktivitesi gibi faktörler in vitro antimikrobiyal aktiviteyi etkiler (11, 12, 14, 26, 48).

Sağlam ve ark. (47), antibiyotik emdirilmiş disklerin boyanmasında kullanılan bazı boyaların diffüzyon testlerinde antibiyotik inhibisyon zonunu etkilediğini saptamışlardır.

Bir infeksiyonun sağıtımında, infeksiyona neden olan mikroorganizmanın identifikasyonu ve antibiyogram testleri ile uygun antibiyotiğin belirlenmesinin yanısıra antibiyotik seçiminde, antibiyotiğin toksisite, protein bağlama, vücutta yayılımı, absorpsiyon ve vücuttan atılım şekilleri gibi farmakolojik özelliklerinin bilinmesi gerekir. Ayrıca sağıtımında kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde infeksiyona neden olan mikroorganizmanın belirlenen bir antibiyotiğe karşı doğasında mevcut olan in vitro duyarlılık durumu ile konakçının yaşı, gebelik ve immunité durumu da dikkate alınmalıdır (11, 21, 36).

Bazı kemoterapötik maddelerin kullanılmasının Klostridial aşular ile aşılanmış hayvanlarda serum antitoksin titresinde düşüğe neden olduğu bildirilmiştir (32).

Mikroorganizmaların özellikle bakterilerin kemoterapötik maddelere direnç kazanmaları karşısında infeksiyöz hastalıkların sağıtımında dirençlilik derecelerinin bilinmesi ve buna bağlı olarak sağıtımcı dozun seçilmesi önem kazanmış ve mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere duyarlılıklarının saptanması için metodlar geliştirilmiştir.

Gerek aerob gerekse anaerob mikroorganizmalarda antimikrobiyal aktivitenin saptanmasında iki temel metod kullanılmaktadır. Bunlar dilüsyon ve diffüzyon metodlarıdır (5, 8, 10, 13, 21, 26).

Dilüsyon metodu, antimikrobiyal maddelerin minimum inhiye edici konsantrasyonlarını (MIC) veren kantitatif bir methoddur. Dilüsyon testleri sıvı veya katı besiyerlerine değişik konsantrasyonlarda antimikrobiyal madde katılmak sureti ile gerçekleştirilir. Çok duyarlı olan bu yöntem uzun manipulasyonları gerektirdiğinden sistematik incelemelerde kullanılmaktadır (5, 11, 18, 21).

Tüp Dilüsyon, Buyyon Dilüsyon, Makro Dilüsyon gibi isimler de verilen sıvı ortamda dilüsyon yönteminde antibiyotik, içinde sıvı besiyeri bulunan bir seri tüpte gittikçe azalan oranlarda dilüe edilir. Daha sonra tüplere eşit miktarda bakteri inokule edilir. Duyarlılığı saptanan bakterinin üremesine uygun olan bir inkubasyon süresi sonunda bakteri üremesinin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu (MIC) belirlenmek sureti ile bakterinin duyarlılık derecesi saptanır (5, 10, 21, 23).

Buyyon dilüsyon metodunda modifikasyonlar yapılarak mikro dilüsyon metodu geliştirilmiştir. Çeşitli araştırmacılar (16, 23, 28, 34, 46) tarafından,

mikro dilüsyon metodu ve buyyon dilüsyon metodu ile elde edilen MIC değerlerinde %92.5-%95 birlik sağlandığı ve bu iki testin sonuçları arasında ± 1 veya ± 2 dilüsyonluk (\log_2) bir fark olduğu bildirilmiştir.

Buyyon disk metodu, broth disk elüsyon testi olarak da isimlendirilir ve bu yöntem, buyyon dilüsyon testlerini basitleştirmek amacı ile Wilkins ve Theil tarafından geliştirilmiştir. Bu metotta antibiyotikler sıvı besiyeri içinde absorbe edilirler. Benzer fakat çok daha basit, bu nedenle de daha pratik olan bir yöntem de Kurzynski ve ark. tarafından geliştirilmiştir (10, 19, 21, 51).

Katı ortamda dilüsyon yönteminin kesin sonuç veren bir yöntem olmakla birlikte rutin testlerde kullanışlı olmadığı bildirilmektedir (5, 18). Bu metod, çizgi yöntemi, nokta ekim yöntemi, Szybalske gradient yöntemi ve Fleming'in agar kanal yöntemi olmak üzere çeşitli şekillerde uygulanabilir (5, 21). Ayrıca bir çok araştırmacı (2, 9, 18, 25, 26, 29, 30, 40, 41, 53, 54). tarafından yapılan çalışmalar ile, mikroorganizmaların optimum üreme koşulları dikkate alınarak, besiyerleri ve besiyerlerine katılan maddelerde değişiklikler yapılmak sureti ile metotta modifikasyonlar yapılmıştır.

Disk diffüzyon veya agar diffüzyon metodu olarak isimlendirilen yöntem, bakterilerin bir çok antibiyotiğe karşı duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan kalitatif bir testtir. Aerobik mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığının saptanmasında günümüzde en çok Kirby-Bauer Disk Diffüzyon Metodu ve Barry ve ark. tarafından geliştirilen Agar Overlay metodu'nun kullanıldığı bildirilmektedir (5, 10, 11, 18, 21, 26, 55, 56).

Diffüzyon yönteminde antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler besi yerlerine yerleştirilir ve disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılıkları saptanır (5, 8, 21, 26, 48, 55).

Disk diffüzyon testlerinin anaerobik mikroorganizmalarda kullanımının sınırlı olduğu bildirilmesine karşın (5, 10, 21), Kwak ve ark. (40) tarafından agar dilüsyon metodu ile paralel olarak yapılan bir çalışmada, disk diffüzyon testinin kısmen güvenilir sonuçlar verdiği ve dilüsyon testlerinin yapılabilmesi için yeterli malzeme bulunmayan laboratuvarlarda, disk diffüzyon metodunun kullanılabilceği bildirilmiştir. Yine Sutter ve ve ark. (50), disk diffüzyon testinin rutin kullanım için önermektedirler.

MATERYAL VE METOD

Test Suşu : Bu çalışmada Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü Anaerob Bölümü suş stokundan sağlanan liyofilize Clostridium welchii (CI. perfringens) Tip A 107 suşu kullanıldı.

Liyofilize halde bulunan bu suş 1 ml steril fizyolojik tuzlu su ile sulandırılarak taze hazırlanan kanlı agar'a inokule edildi. Agar petripleri B.T.L. Londra Anaerob jarı içine yerleştirilerek jarın havası alındı ve 37° C'de 18 saat inkube edildi. Bu kanlı agar kültüründen 3-4 koloni (3 mm'lik bir öze dolusu) alınarak taze hazırlanmış %5 oranında %25 'lik glikoz solüsyonu ve %5 koyun kanı katılmış Nutrient agar (Oxoid) üzerine inokule edilerek yukarıda belirtilen şekilde inkube edildi. Bu kültürden 3-4 koloni alınıp, 15 dakika kay-

natılıp soğutulmuş olan kıymalı buyyon'a inokule edildikten sonra 37° C'de 18 saat inkube edildi. Suş kıymalı buyyon'da idame ettirildi.

Antibiyotik Solüsyonları : Penisilin, gentamisin ve tetrasiklin disk ve toz halinde Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Disk Üretim Laboratuvarından sağlandı.

Penisilin, gentamisin ve tetrasiklin'in 1000 µg/ml ve 2560 µg/ml olacak şekilde stok solüsyonları hazırlandıktan sonra 2 ml miktarlarında küçük şişelere bölünerek -20°C saklandı. Antibiyotik solüsyonları çözdürüldükten sonra tekrar dondurulmadı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri : Bu çalışmada kullanılan metodlarda inokulumda bir örneklik sağlanması amacı ile inokulumun türbiditesi metodlarda bildirilen besiyerleri kullanılarak Mac Farland Standart I' e göre ayarlandı.

Buyyon Dilüsyon Metodu: Bu metodun uygulanışında Major ve ark. (42). tarafından bildirilen yöntemden yararlanıldı.

Fluid thioglycollate medium (Difco), hazırlanarak 16x125 mm'lik vidalı kapaklı tüplere 4.5 ml. miktarlarında taksim edildi. Sterilize edildikten sonra 2-8° C'de saklandı. Organizmanın kanlı agar kültüründen 3-4 koloni (3 mm'lik bir özel dolusu) alınarak 15 dak. kaynatılıp hemen soğutulan thioglycollate broth'a inokule edildi ve 37° C'de 18 saat inkube edildi. İnokulum, 18 saatlik bu kültürün türbiditesi Mac Farland Standart I'e göre ayarlanarak hazırlandı. Antibiyotiklerin 1000 µg/ml'lik stok solüsyonlarından 0.5 ml alınarak 4.5 ml thioglycollate içerisine konuldu. Bu dilüsyon başlamak üzere thioglycollate broth ile iki katlı dilüsyonları yapıldı. Antibiyotik dilüsyonlarını içeren tüplere 2'şer ml inokulum konuldu. Böylece antibiyotiklerin 50 µg/ml-0.09 µg/ml arasında değişen final konsantrasyonları elde edildi. Tüpler 37° C'de 18 saat inkube edildi. Gözle görülebilir üreme saptanmayan en düşük antibiyotik konsantrasyonu MIC olarak değerlendirildi.

Mikro Dilüsyon Metodu : Bir metodun uygulanışında Gavan ve Town (23) tarafından bildirilen yöntemden yararlanıldı.

Brain heart infusion broth (BHI broth) (Oxoid) hazırlanarak 16x125 mm'lik vidalı kapaklı tüplere 10 ml miktarında konuldu. Sterilize edildikten sonra 2-8° C'de saklandı. Kullanılmadan önce 15 dak. kaynatılıp hemen soğutuldu ve içine Pastör pipeti ile %25'lik glikoz solüsyonunda 10 damla ilave edildi. Organizmanın kanlı agar kültüründen 3-4 koloni alınarak bu besiyerline inokule edildi ve BTL anaerob jarı içine yerleştirildi. Jarin havası alınarak 37° C'de 18 saat inkube edildi. İnokulum, 18 saatlik BHI broth kültürünün türbiditesi Mac Farland Standart I'e göre ayarlanarak hazırlandı. Antibiyotiklerin 1000 µg/ml'lik stok solüsyonundan 1 ml alınarak, 4 ml BHI broth içerisine katıldı. Böylece antibiyotiklerin 200 µg/ml'lik çalışma solüsyonu hazırlandı. Bu çalışmada U tabanlı 96 delikli steril mikrotitrasyon plate'leri kullanıldı. Plate'lerin vertikal sırasındaki ilk deliklere çalışma solüsyonundan 100 µl konuldu. Horizontal sırada ise 2-12. deliklere 50 µl BHI broth konuldu. Birinci delikten 50 µl antibiyotik solüsyon alınarak 2. deliğe aktarıldı. Aynı işlem diğer deliklerde de tekrarlanarak antibiyotiklerin iki

katlı dilüsyonu yapıldı. 12. deliklere antibiyotik aktarılmadı ve bu delikler üreme kontrolü olarak kullanıldı. Üreme ve besiyeri kontrolü olarak ayrılan delikler dışındaki tüm deliklere 50'şer µl inokulum konuldu. Böylece antibiyotiklerin 100-0.09 µg/ml arasında değişen final konstantrasyonları elde edildi. Plate'lerin kapağı kapatılarak desikatör içine yerleştirildi ve 37 ° C'da 18 saat inkube edildi. Sonuçlar ışık altında okundu. Ve görülür bir üreme (bulanıklık) olmayan en düşük antibiyotik konsantrasyonu MIC olarak değerlendirildi.

Agar Dilüsyon Metodu : Bu metodun uygulanışında Sutter ve ark. (51) tarafından bildirilen yöntemden yararlanıldı.

Organizmanın kanlı agar kültüründen 3-4 koloni alınarak 15 dak. kaynatılıp soğutulmuş thioglycollate broth'a inokule edildi ve 37° C'de 18 saat inkube edildi. İnokulum, bu kültürün türbiditesi Mac Farland Standart I'e göre ayarlanarak hazırlandı. Taze olarak hazırlanan Brucella agar (Difco) sterilize edildikten sonra 50 ° C'ye soğutuldu. İçine %5 defibrine koyun kanı ve 10 µg/ml olacak şekilde K1 vitamini ilave edildi. Antibiyotiklerin 2560 µg/ml'lik stok solüsyonlarından Tablo 1'de belirtilen şekilde, steril distile su ile dilüsyonlar hazırlandı ve her bir dilüsyon 18 ml. agar içine katıldı. Böylece antibiyotiklerin agar içinde 0.015-256 µg/ml arasında değişen final konstrasyonları elde edildi. Agar petripleri kuruması için 37° C 'de 30 dak. tutulduktan sonra 5 µl inokulum agar üzerine inokule edildi ve inokulum yayılmadan bırakıldı. Üreme ve besiyeri kontrolü için birer adet petri teste ilave edildi. Petripler BTL anaerob jar içine yerleştirilerek havası alındı ve 37° C'e 18 saat inkube edildi. İnokulum bölgesinde üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MIC olarak değerlendirildi.

Tablo 1. Agar Dilüsyon Metodunda Antibiyotik Dilüsyonlarının Hazırlanması.

	Konsantrasyon (µg veya U)	Final Konsantrasyon 18 ml AB + 2 ml agar (µg veya U/ml)
Stok sol.*	2560	256
4 ml (2560)+ 4 ml su	1280	128
2 ml (2560)+ 6 ml su	640	64
2 ml (2560)+ 14 ml su	320	32
4 ml (320)+ 4 ml su	160	16
2 ml (320)+ 6 ml su	80	8
2 ml (320)+ 14 ml su	40	4
4 ml (40)+ 4 ml su	20	2
2 ml (40)+ 6 ml su	10	1
2 ml (40)+ 14 ml su	5	0.5
4 ml (5)+ 4 ml su	2.5	0.25
2 ml (5)+ 6 ml su	1.25	0.125
2 ml (5)+ 14 ml su	0.62	0.062
4ml (0.62)+ 4 ml su	0.31	0.031
2 ml (0.62)+ 4 ml su	0.15	0.015

* µg/ml + ml su

Buyyon Disk Metodu : Bu metodun uygulanışında Kurzynski ve ark. (bak 10) tarafından geliştirilen yöntemden yararlanıldı.

CI. welchii Tip A'nın kanlı agar kültüründen 3-4 koloni alınıp kullanılmadan önce 15 dak. kaynatılıp hemen soğutulan kıymalı buyyona inokule edilerek 37° C'de 18 saat inkube edildi. Bu kültürün türbiditesi, 15 dak. kaynatılıp hemen soğutulan thioglycollat broth ile Mac Farland Standrat I'e ayarlandı. Fluid Thioglycollate Medium (Difco) hazırlanarak 16x125 mm'lik vidalı kapaklı tüplere 5'er ml miktarlarında taksim edildi. Sterilize edildikten sonra 2-8° C'de saklandı. Besiyeri kullanılmadan önce 15 dak. kaynatılıp hemen soğutuldu. Her antibiyotik için iki seri halinde besiyeri içeren tüp hazırlandı ve birinci tüpten başlayarak her tüpe giderek artan sayıda antibiyotik emdirilmiş disk konuldu. Tüplere konulan disk sayısı gentamisin için 1 ile 10 disk, penisilin ve tetrasiklin için ise 1/4 ile 10 disk arasında değişti.

Tablo 2. Buyyon Disk Metodunda Besiyerine Katılan Diskler ve Konsantrasyonları

Antibiyotik	Disk içeriği µg veya IU	Disk sayısı 5 ml'de	Final konsant µg veya IU
Penisilin	10 *	1	1
Tetrasiklin	30	1 **	1 **
Gentamisin	10	1	1

*, IU

** , 10 ml besiyeri

Böylece penisilin 0.5-20 IU/ml, gentamisin için 2-20 µg/ml, tetrasiklin için ise 0.75-20 µg/ml arasında değişen final konsantrasyonlar elde edildi. Antibiyotiklerin besiyerine difüzyonunu sağlamak amacı ile tüpler oda derecesinde iki saat bekletildi. Hazırlanan inokulumdan disk içeren her tüpe ve üreme kontrolü olarak kullanılan ve disk içermeyen iki tüpe 50'şer µl inokule edildi. Ayrıca iki tüp besiyeri kontrolü olarak kullanıldı ve tüm tüpler 37° C'de 18 saat inkube edildi. Bu inkubasyon sonunda gözle görülebilir üreme olmayan en düşük antibiyotik konsantrasyonu, MIC olarak değerlendirildi.

Agar Diffüzyon Metodu: Bu metodun uygulanışında Sutter ve ark. (50) tarafından bildirilen yöntemden yararlanıldı.

Inokulum, 18 saatlik thioglycollate broth kültürün türbiditesi Mac Farland Standart I'e göre ayarlanarak hazırlandı. Taze olarak hazırlanan Brucella agar (Difco) sterilize edildikten sonra 50° C'a soğutuldu ve içine %5 defibrine koyun kanı ve 0.5 µg/ml olacak şekildeki K1 vitamini ilave edilerek petrilere 5-6 mm kalınlığında döküldü. Kullanılmadan önce 37° C'de 30 dak. tutularak kuruması sağlandı. İki seri halinde hazırlanan petrilere 2'şer ml inokulum ko-

nuldu ve inokulumun fazlası pipet ile geri alındı. Agar üzerine antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler yerleştirildi. Disk içermeyen bir petri üreme kontrolü, disk ve inokulum içermeyen bir petri de besiyeri kontrolü olarak kullanıldı. Petriler BTL anaerob jarı içine yerleştirildi ve havası alınarak 37° C'de 18 saat inkube edildi. Sonuçlar disklerin etrafındaki inhibisyon zonu ölçülmek sureti ile değerlendirildi.

BULGULAR

Bu çalışmada, *CI. welchii* Tip A 107 suşunun penisilin G, tetrasiklin ve gentamisin'e karşı duyarlılığı buyyon disk, buyyon dilüsyon, mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve agar diffüzyon metodları ile saptanmış olup, penisilin, gentamisin ve tetrasiklin'in MIC değerleri Tablo 3'de gösterilmiştir. Agar diffüzyon metodunda agar üzerinde homojen bir üreme olmadığı için sonuçlar değerlendirilemedi. Bu nedenle Tablo 3'de agar diffüzyon metodunda antibiyotiklerin zon çaplarına ait değerleri verilmemiştir. Buyyon dilüsyon metodunda penisilin, gentamisin ve tetrasiklin için sırasıyla 0,781 µg/ml, 25 µg/ml ve 1,562 µg/ml MIC değerleri saptanmıştır. Mikro dilüsyon metodunda elde edilen MIC değerleri penisilin için 0,390 µg/ml, gentamisin için 3,125 µg/ml ve tetrasiklin için ise 0,781 µg/ml olarak saptanmıştır. Agar dilüsyon metodunda ise elde edilen MIC değerleri penisilin için 4 µg/ml, gentamisin için 8 µg/ml ve tetrasiklin için 1 µg/ml olarak bulundu.

Buyyon disk metodunda, 10 IU penisilin G emdirilmiş 1/4 disk içeren tüplerde üreme meydana geldi. 1/2 ve daha fazla disk içeren tüplerde üreme görülmedi. Gentamisin diski (10µg) konulan tüplerde, 9 disk içeren tüp de dahil olmak üzere tüm tüplerde üreme görüldü, 10 adet disk içeren tüpte ise üreme meydana gelmedi. Tetrasiklin diski (30 µg) konulan tüplerde ise 1/4 disk konulan tüplerde üreme meydana geldi, 1/2 disk ve daha fazla disk içeren tüplerde üreme görülmedi. Buyyon disk metodu ile penisilin için 1,0 IU/ml (0,6 µg/ml), gentamisin için 20 µg/ml ve tetrasiklin için 1,5 µg/ml MIC değeri saptandı.

Tablo 3. *CI. welchii* Tip A'nın Duyarlılık Testlerinde Penisilin, Gentamisin ve Tetrasiklin MIC Değerleri

Metodlar	MIC Değerleri (µg/ml)					
	Penisilin *		Gentamisin		Tetrasiklin	
	(-) **	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Buyyon Dilüsyon	0,781	0,390	25,0	12,5	1,562	0,781
Mikro Dilüsyon	0,390	0,195	3,125	1,562	0,781	0,390
Agar Dilüsyon	4,0	2,0	8,0	4,0	1,0	0,5
Buyyon Disk	1,0	0,5	20,0	18	1,5	0,5

*, Buyyon disk metodunda birim IU (1 IU=0,6 µg) **,-)= üreme inhibisyonu (+)= üreme başlangıcı

Tetraksiklin için tüm testlerde saptanan MIC değerleri arasında paralellik görülmektedir. Penisilinde elde edilen MIC değerleri agar dilüsyon metodunda diğer metotlara kıyasla oldukça yüksek bulundu. Gentamisinde ise buyyon dilüsyon ve buyyon disks metodları ile elde edilen MIC değerlerinde paralellik görülmesine karşın agar dilüsyon ve mikro dilüsyon metodu ile farklı MIC değerleri elde edildi. Gentamisinin MIC değeri haricinde mikrodilüsyon metodu ile elde edilen MIC değerleri, buyyon dilüsyon metodu ile elde edilen değerlerden bir dilüsyon basamağı (\log_2) düşük bulundu. Çalışmamızda dene- nen metodların yapılan tüm tekrarlarında benzer sonuçlar alındı. Buyyon dilüsyon ve buyyon disk metodlarında her üç antimikrobiyal maddenin MIC değerleri arasında ise tam bir uyum saptandı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada kullanılan her üç antimikrobiyal maddenin MIC değerleri buyyon dilüsyon ve buyyon disk yöntemlerinde, tetrasiklin MIC değerleri ise kullanılan tüm metotlarda paralellik göstermektedir.

Major ve ark. (42), yedi *Cl. welchii* suşunun antibiyotiklere duyarlılığını saptamışlar ve buyyon dilüsyon yöntemi ile saptanan penisilin MIC değerlerinin 0,2-1,6 IU/ml arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Traub ve Sherris (55) tarafından, Giovvannini'ye atfen *Cl. welchii*'nin 0,006-1 IU arasındaki penisilin konsantrasyonlarında inhibe olduğunu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar (55). 23 adet *Cl. welchii* suşunun 0,12 µg/ml (0,2 IU/ml) veya daha az penisilin konsantrasyonlarında inhibe olduklarını saptamışlardır. Bu çalışmada *Cl. welchii* Tip A 107 suşu'nun, buyyon dilüsyon, mikro dilüsyon, agar dilüsyon ve buyyon disk metodlarında sırasıyla 0,781 µg/ml, 0,390 µg/ml, 4 µg/ml ve 1 IU/ml penisilin konsantrasyonlarında inhibe olduğu saptandı. Penisilin için saptanan bu MIC değerleri literatürler ile uygunluk göstermektedir.

19 adet *Cl. welchii* suşunun mikro dilüsyon metodu ile yapılan duyarlılık testinde saptanan tetrasiklin MIC değerlerinin 0.1-6.2 µg/ml arasında değiştiği saptanmıştır (46). Çalışmamızda tetrasiklin için MIC değerleri, buyyon dilüsyon metodunda 1,562 µg/ml, mikro dilüsyon metodunda 0.781 µg/ml, agar dilüsyon metodunda 1 µg/ml ve buyyon disk metodunda 1.5 µg/ml olarak bulundu. Çalışmamızda elde edilen tetrasiklin MIC değerleri literatürde bildirilen değerler ile uygunluk içindedir.

Diğer antibiyotiklerden farklı olarak gentamisinin anaerobik mikroorganizmaların çoğuna karşı inaktif olduğu kaydedilmiş ve *Cl. welchii* suşlarının mikro dilüsyon metodu ile 25-100 µg/ml arasındaki gentamisin konsantrasyonlarında inhibe olduğu bildirilmiştir (46). Bu çalışmada ise gentamisin MIC değerleri buyyon dilüsyon, mikro dilüsyon, agar dilüsyon ve buyyon disk metodlarında sırasıyla 25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 8 µg/ml ve 20 µg/ml olarak saptandı. Buyyon dilüsyon ve disk dilüsyon metodları ile elde edilen değerler literatürde bildirilen değerler ile uygunluk göstermektedir. Ancak

mikro dilüsyon metodu ile saptanan değerler arasında farklılık görülmektedir. Bu farklılık, uygulanan metodlarda değişik besiyerlerinin kullanılmış olmasından kaynaklanabilir.

Mikro dilüsyon testinin, buyyon dilüsyon testinden iki dilüsyon basamağı (\log_2) daha düşük bulunduğu bildirilmiştir (54). Harwick ve ark. (28), buyyon dilüsyon metodu ile mikro dilüsyon metodu arasında iki dilüsyon basamağı farkın kabul edilebilir olduğunu ve yaptıkları çalışmada bu iki metodun sonuçları arasında %87.5 oranında uygunluk sağladıklarını bildirmişlerdir. Chitwood (16) tarafından ise mikro dilüsyon testi ile buyyon dilüsyon testi arasında %94 oranında paralellik sağlandığı bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da gentamisin hariç iki antimikrobiyal maddenin buyyon ve mikro dilüsyon metodları ile elde edilen MIC değerleri arasında bir dilüsyon basamağı fark bulunmuştur. Mikro dilüsyon metodunun tekrarlanabilirliği %94.8 olarak bildirilmesine karşın buyyon dilüsyon metodunda bu oranın %99.1 olduğu kaydedilmiştir (23). Bizim çalışmamızda da mikro dilüsyon testinde bazı tekrarlar da sonuçlarda çok az fark görüldü. Buyyon dilüsyon ve buyyon disk metodlarında ise yapılan tüm tekrarlar da aynı sonuçlar elde edildi ve bu testlerin tekrarlanabilirlik oranı %100 olarak belirlendi.

Traub (54) tarafından, agar dilüsyon testi ile elde edilen MIC değerlerinin, mikro dilüsyon testi ile elde edilen değerlerden düşük bulunduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, agar dilüsyon ve mikro dilüsyon testleri ile elde edilen tetrasiklin MIC değerleri uygunluk içinde olmakla birlikte penisilin ve gentamisinde agar dilüsyon testi ile elde edilen MIC değerleri yüksek bulunmuştur.

Sapico ve ark. (48), ve Du Preez ve ark. (19) disk diffüzyon metodunun CI. welchii'nin duyarlılığının saptanmasında kullanılabileceğini bildirmelerine karşın Traub (54), agar diffüzyon metodunda elde edilen zon çapları ile agar dilüsyon metodunda elde edilen MIC değerleri arasında pozitif bir korelasyon saptanmadığını bildirmiştir. Bazı araştırmacılar (10,21) agar diffüzyon testinin anaerob mikroorganizmaların duyarlılık testlerinde kullanışlı olmadığını bildirmektedirler. Bu çalışmada da agar yüzeyinde homojen bir üreme olmadığı için test sonuçlarının değerlendirilmesinde güçlüklerle karşılaşmıştır. Saptanabilen zon çaplarının büyüklüğü ile diğer metodlarda elde edilen MIC değerleri arasında uygunluk görülmemesinin yanısıra yapılan tekrarlar da farklı inhibisyon zonları ortaya çıkmıştır. Bu durum besiyeri içine katılan maddelerden ileri gelebilir. Besiyerlerine kan, serum, plazma gibi protein derivelere katılmasının penisilinlerin albuminle bağlanmasına neden olduğu ve özellikle penisilin K ve daha az olmak üzere Penisilin G ve F'nin etkisini azalttığı bildirilmektedir (26).

Buyyon dilüsyon testi ile karşılaştırıldığında, mikro dilüsyon testinde MIC değerlerinde elde edilen ± 1 veya ± 2 dilüsyon basamağı (\log_2) farkın, mikro plate'ler 2.5 saat UV altında tutularak mikro plate'lerdeki statik elektrik yükünün ortadan kaldırılması ile elimine edilebileceği ve bu işlem yapıldığında mikro dilüsyon testinin rutin olarak kullanılabileceği, anaerob mikroorganizmaların duyarlılığının saptanmasında ise gaz alışverişinin sağlanabilmesi için plate'lere kapatılan yapışkan bantta plate çukurları üzerinde steril bir toplu iğne ile küçük delikler açılması gerektiği bildirilmiştir (23). Ancak literatürde belirti-

lenler uygulamada pratik olmamaktadır. Ayrıca plate'lerin aerobik koşullarda inkube edilmesi gerekmektedir. Fakat plate'ler, standart büyüklükte olan jarlar (BTL anaerob jar, Gas pak jar) içine sığmadığından anaerob koşullarda inkubasyonda sorunlarla karşılaşmıştır. Yine agar dilüsyon ve agar diffüzyon metodlarında inokülü edilen petrilere anaerobik koşullarda inkube edilmeleri gerekmektedir. Özellikle agar dilüsyon metodunda testte çok sayıda petri kullanıldığından, klinik laboratuvarlarında anaerobik izolatların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları saptanmak istendiğinde, çok sayıda jar veya anaerobik ortamı sağlayabilecek özel inkubatore ihtiyaç duyulacaktır. Fakat buyyon dilüsyon ve buyyon disk metodlarında tüplerin anaerobik koşullarda inkube edilmeleri zorunlu olmayıp, tüpler tüm teşhis laboratuvarlarında mevcut olan hava dolaşımli inkubatorlerde inkube edilebilirler.

Mikro dilüsyon yönteminin masraflarının buyyon dilüsyon metodunun 1/3'ü kadar olduğu bildirilmektedir (28). Ancak mikro dilüsyon metodu için gerekli olan mikro plate, otomatik pipet ve pipet ucu gibi alet ve malzemeler ülkemizde üretilmediğinden bu malzemelerin sağlanması ülkemiz koşullarında ekonomik olmamaktadır.

Agar dilüsyon metodu pek çok araştırmacı (7, 9, 25, 29, 31, 38, 44) tarafından rutin çalışmalarda kullanılmasına karşın yeni antibiyotiklerin aktivitelerinin denenmesi (2, 41,53), aktarılan direnç durumlarının saptanması (1), anaerobik basillerin klasifikasyonu (22) gibi çalışmalarda kullanılmakta olup, kullanılan besiyerleri ve besiyerlerine katılan çeşitli maddelerin test sonuçlarını etkilemesi (12, 14, 26) ve testin uygulanışının zaman ve elemene ihtiyaç göstermesi nedeni ile daha çok referans bir test olduğu bildirilmektedir (18).

Buyyon dilüsyon testi uygulaması uzun süren bir test olarak değerlendirilmekle birlikte rutin olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (20, 37, 42, 46, 55). Buyyon disk metodu da rutin olarak kullanılabilen bir metodur (19).

Sonuç olarak, yapılarının kolay olması, yardıma ihtiyaç duyulmadan tek bir eleman tarafından gerçekleştirilebilmeleri, yapılan tüm tekrarlar da aynı sonuçlar elde edilmiş olmasının yanısıra ülkemizdeki tüm teşhis laboratuvarlarında bulunabilen besiyeri alet ve malzeme ile yapılabilmeleri mümkün olduğu için buyyon dilüsyon ve buyyon disk yöntemlerinin ülkemizdeki teşhis laboratuvarlarında rutin çalışmalarda kullanabileceği kanaatine varılmıştır.

ÖZET

Bu çalışmada ülkemizdeki teşhis laboratuvarlarında kullanılacak en çabuk,kolay, güvenilir ve ucuz yöntemin seçilmesi amacı ile, C. welchii (CI. perfringens) Tip A'nın penisilin, gentamisin ve tetrasikline duyarlılığında buyyon dilüsyon, mikro dilüsyon, agar dilüsyon, buyyon disk ve agar diffüzyon metodları karşılaştırılmalı olarak çalışıldı.

Buyyon dilüsyon, mikro dilüsyon, agar dilüsyon ve buyyon disk yöntemleri ile penisilin MIC değerleri sırasıyla 0,781 µg/ml, 0,390 µg/ml, 4 µg/ml ve 1 IU/ml (0,6 µg/ml), gentamisin MIC değerleri 25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 8 µg/ml ve 20 µg/ml, tetrasiklin MIC değerleri 1,562 µg/ml, 0,781 µg/ml,

1 µg/ml ve 1.5 µg/ml olarak saptandı.

Testlerde kullanılan antibiyotiklerin MIC değerleri yönünden buyyon dilüsyon ve buyyon disk metodları arasında tüm tekraralarda uyumlu sonuçla elde edildi ve her iki metodun da tekrarlanabilirlik oranı %100 olarak saptandı.

Ülkemizdeki tüm teşhis laboratuvarlarında bulunabilecek alet ve malzeme ile yapılabilmesi, çabuk, kolay ve güvenilir olmaları nedeni ile buyyon dilüsyon ve buyyon disk metodları rutin olarak uygulanabilir bulunmuştur.

SUMMARY

In this study, the susceptibility test of *Cl. welchii* type A (*Cl. perfringens*) to penicillin, gentamicin and tetracycline were performed by using broth dilution, micro dilution, agar dilution, broth disc and agar diffusion methods in order to determine a rapid, easy, reliable method applicable to diagnostic laboratories.

The MIC values determined by broth dilution, micro dilution, agar dilution and broth disc methods for penicillin were 0.781 µg/ml, 0.390 µg/ml, 4 µg/ml and 1 IU/ml (0.6 µg/ml), for gentamicin were 25 µg/ml, 3.125 µg/ml, 8 µg/ml and 20 µg/ml, for tetracycline were 1.562 µg/ml, 0.781 µg/ml, 1 µg/ml and 1.5 µg/ml respectively.

The results of broth dilution and broth disc methods were always in agreement and the reproducibility of these methods were 100 %.

Broth dilution and broth disc methods were found applicable to diagnostic laboratories, since they were rapid, easy to perform, reliable and also applicable with the media, equipment and glassware present in all diagnostic laboratories in our country.

KAYNAKLAR

- 1- Ackerman, V.P., Obbnik, D.J.G. and Sivertsen, T.: Transferable antibiotic resistance in a general hospital. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 6 : 251 - 262, 1983.
- 2- Appelbaum, P.C., Jacobs, M.R., Spangler, S.K. and Yamabe, S.: Comparative activity of β - Lactamase inhibitors YTR 830, clavulanate, and sulbactam combined with β-Lactams against β-Lactamase-Producing Anaerobes. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 30 : 789-791, 1986.
- 3- Arda, M.: Genel Bakteriyoloji. 2 Baskı, Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayınları : 369, Ders Kitabı : 267, s. 184-215, 1981.
- 4- Arda, M., Minbay, A. ve Aydın, N. : Özel Mikrobiyoloji. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayınları : 386, Ders Kitabı : 284, s. 392-511, 1982.
- 5- Aydın, N.: Antibiyotik duyarlılık "Antibiyogram" teknikleri. Uygulamalı Hizmet İçi Eğitimi Seminer Notları, İstanbul, 1979.

- 6- Aydın, N., İstanbulluoğlu, E. ve Aydın, N. : Yemlere katılan çeşitli antibiyotiklerin civciv ve piliçlerin barsak florasındaki Koliform grubu bakterilerin direnç durumları üzerine etkisi. Doğa, TU Vet ve Hay. Derg., 8 : 5-16, 1984.
- 7- Baba, E., Fukua, T., Arakawa, A., Ikawa, H. and Takeda, M.: Antibiotic susceptibility of *Fusobacterium necrophorum* from bovine hepatic abscesse. Br. Vet. J., 145 : 195-197, 1989.
- 8- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Truck, M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45 : 493-496, 1966.
- 9- Benno, Y., Endo, K. and Mitsuoka, T.: Isolation of fecal *Clostridium perfringens* form broiler chickens and their susceptibility to eight antimicrobial agents for growth promotion. Jpn. J. Vet. Sci., 50: 832-834, 1988.
- 10- Beşe, M.: Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri. Kardeşler Basımevi, İstanbul, 1989.
- 11- Bilgehan, H.: Kemoterapötik Maddeler ve Mikroorganizmalar. Bilgehan Basımevi, İzmir, s. 196-223, 1983.
- 12- Brobio, M.V. Pascual, A., Dominguez, M.C., and Perea, E.J.: Effect of medium, pH, and inoculum size on activity of Ceftizoxime and Sch-34343 against anaerobik bacteria. Antimicrob. Ag. Chemother., 30: 626-627, 1986.
- 13- Bourdon, J.L., Marchall, N.: Techniques Bacteriologiques, Doin Editeurs, pp. 235-275, 1973.
- 14- Brenner, V.C. and Sherris, J.C.: Influence of different media and bloods on the results of diffusion antibiotic susceptibility test. Antimicrob. Ag. Chemother., 1 : 116-122, 1971.
- 15- Bryan, E.L.: General mechanism of resistance to antibiotics. J. Antimicrob. Chemother., 22, Suppl. A, 1-15, 1988.
- 16- Chitwood, L.A.: Tube dilution antimicrobial susceptibility testing: Efficacy of a microtechnique applicable to diagnostic laboratories. Appl. Microbiol., 17 : 707-709, 1969.
- 17- Chopra, I.: Mechanisms of resistance to antibiotics and other chemotherapeutic agents. J. Appl. Bacteriol. Symposium Suppl. 1495-1665, 1988.
- 18- Degener, J.E., Thonus, I.P. and Michen, M.F.: The antimicrobial susceptibility test A comparison of the results of four methods. J. Appl. Bacteriol., 50 : 505-517, 1981.

- 19- Du Preez, J.H., Greeff, A.S. and Eksteen, N.: Isolation and significance of anaerobic bacteria isolated from cases of bovine mastitis. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 48 : 123-125, 1981.
- 20- Egerton, J.R., Parsonson, I.M. and Graham, N.P.H.: Parenteral chemotherapy of ovine Foot-Rot. *Aust. Vet. J.*, 44: 275-283, 1968.
- 21- Erdeğer, J. : Antibiyotik duyarlılık testleri ve uygulama alanları. *Etlik Vet. Mikrobiol. Derg.*, 7: 1-26, 1990.
- 22- Finegold, S.M., Harada, N.E. and Miller, L.G.: Antibiotic susceptibility pattern as aids in classification and characterization of Gram-negative anaerobic bacilli. *J. Bacteriol.*, 94 : 1443-1450, 1967.
- 23- Gavan, T.L. and Town, M.A.: A microdilution method for antibiotic susceptibility testing: An evaluation. *Am. J. Clin. Pathol.*, 53 : 880-885, 1970.
- 24- Glisan, G.L., Steele, J.H., Whitford, H., Christensen, B.L. and Kapadia, A.: Antimicrobial resistance and susceptibility in five bacterial pathogens: A comparison of susceptibility tests in 1974 and 1978. *J.A.V.M.A.*, 180 : 655-668, 1982.
- 25- Goldstein, E.J.C., Citron, D.M.: Comparative in vitro activities of amoxicillin-clavulanic acid and imipenem against anaerobic bacteria isolated from community hospital. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 29 : 158-160, 1986.
- 26- Gürer, İ.: Disk-Plak difüzyon metodu kullanılarak yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonuçlarına etki yapan çeşitli faktörler üzerinde araştırmalar ve bulgular. *Mikrobiyoloji Bülteni, Suppl.*, 1, 1-24, 1971.
- 27- Güven, S.: Anaerob Mikroorganizmalar ve Bakteriyolojik Muayene Metodları. *Pendik Vet. Kont. Araşt. Enst. Yayınları*, İstanbul, 1972.
- 28- Harwick, H.J.: Weiss, P. and Fekety, F.R.: Application of microtitration techniques to bacteriostatic and bactericidal antibiotic susceptibility testing. *J. Lab. Clin. Med.*, 72: 511-516, 1968.
- 29- Hirsh, D.C., Indiveri, M.C., Jang, S.S. and Biberstein, E.L.: Changes in prevalence and susceptibility of obligate anaerobes in clinical veterinary practice *J.A.V.M.A.*, 186 : 1086-1089, 1985.
- 30- Indiveri, M.C., and Hirsh, D.C.: Susceptibility of obligate anaerobes to trimethoprim-sulfamethoxazole. *J.A.V.M.A.*, 188 : 46-48, 1986.
- 31- Ingham, H.R., Selkon, J.B., Codd, A.A. and Hale, J.H.: A study in vitro of the sensitivity to antibiotics of *Bacteriodes fragilis*. *J. Clin. Pathol.*, 21 : 432-436, 1968.

- 32- Itman, R.H., Hassan, A.B., Shawkat, M.E. and Atta, A.H.: Effect of some drugs on the immune response of farm animals to Clostridial vaccines. *Indian Vet. J.*, 63 : 431-437, 1986.
- 33- Jawetz, E., Melnick, I.J. and Aderberg, E.A.: Review of Medical Microbiology 12 th Ed. LANGE Medical Publications, Los Atos, California, 1976.
- 34- Jones, R.N., Barry, A.L., Gavan, T.L. and Washington II, J.A.: Susceptibility Tests : Microdilution and Macrodilution Broth Procedure. In : *Manuel of Clinical Microbiology*. 4 th ed. Ed. EH. LENNETE Am. Soc.. Microbiol., Washington, pp. 972-977, 1985.
- 35- Kamber, U.: Gıdalarda *C. perfringens* Tip A zehirlenmeleri ve önemi. *Vet. Hek. Dern. Derg.*, 60 : 50-59, 1990.
- 36- Kayaalp, O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ulucan Matbaası, Ankara, s. 475-505, 1984.
- 37- Keusch, G.T. and O'Connell, C.J.: The susceptibility of *Bacteroides* to the Penicillins and Cephalotin. *Am. J. Med. Sci.*, 251 : 428-432, 1966.
- 38- Kondo, F. and Tateyama, S.: In vitro activity of chloropolyspoin-C, a new glycopeptide-group antibiotic, on *Clostridium perfringens* isolates and in vivo activity against *C. perfringens* and other intestinal microflora of the caece of broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*, 48 : 175-179, 1990.
- 39- Kurtkaya, M.: Koyun Hastalıkları. Pendik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Yayınları. İstanbul, s. 95-122, 1971.
- 40- Kwok, Y., Tally, F.P., Sutter, V.L., and Finegold, S.M.: Disk susceptibility testing of slow-growing anaerobic bacteria, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 7: 1-7, 1975.
- 41- Leitner, F., Pursiano, T.A., Buck, R.E., Tsai, Y.H., Chisholm, D.R., Misiek, M., Desideiro, J.V., and Kessler, R.E.: BMY 28100, a new oral cephalosporin. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 31 : 238-243, 1987.
- 42- Major, A.N., Strawitz, J.G., Lindberg, R.B., Howard, J.M., and Arzt, C.P. Sensitivities of ten species of *Clostridia* to penicilin, aureomycin, terramycin, and chloramphenicol. *Surgery*, 37: 392-399, 1955.
- 43- Minbay, A., Erdinç, H. ve Berker, A.: Hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımının insan sağlığına etkisi. *Uludağ Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 7: 151-156, 1988.
- 44- Ohm-Smith, M.J., Sweet, R.L., and Hadley, W.K.: Occurance of clindamycin-resistant anaerobic bacteria isolated from cultures taken following clindamycin therapy. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 30: 11-14, 1986.

- 45- Rood, J.I., Buddle, J.R., Wales, A.J. and Sidhu, R.: The occurrence of antibiotic resistance in *Clostridium perfringens* form pigs. *Aust. Vet. J.*, 62: 276-279, 1985.
- 46- Rotilie, C.A., Fass, R.J., Prior, R.B. and Perkins, R.L.: Microdilution technique for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 7: 311-315, 1975.
- 47- Sağlam, M., Arıtürk, S., Anter, U. ve Gümrükçü, E.: Değişik konsantrasyonlardaki boyaların antibiyotik duyarlılık diskleri ile oluşan inhibisyon zonu üzerine etkileri. *GATA Bülteni*, 22: 739-743, 1980.
- 48- Sapico, F.L., Kwock, Y., Sutter, V.L. and Finegold S.M.: S.M.: Standardized antimicrobial disc susceptibility testing of *Clostridium perfringens* to nine antibiotics. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 2: 320-325, 1972.
- 49- Stabler, S.L., Fagerberg, D.J. and Quarlas, C.L.: Effects of oral and injectable Tetracyclines on bacterial drug resistance in feedlot cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 1963-1966, 1982.
- 50- Sutter, V.L., Kwok, Y. and Finegold, S.M.: Standardized antimicrobial disc susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.*, 23: 268-275, 1972.
- 51- Sutter, V.L., Citron, D.M. and Finegold, S.M.: *Susceptibility Testing of Anaerobes*. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. The C.V. Mosby Co., Saint Luis, Missouri, 1980.
- 52- Şanlı, Y., Aydın, N., İzgür, M., Akman, A. ve Baydan, E.: Sağıtıcı bazı antibiyotiklerin hayvan yataştırıcılığında verim artırıcı ve koruyucu amaçlarla kullanılması sonucu bakterilerde gelişen direnç kazanma olgusunun in vivo olarak duyarlı mikroorganizmalarla araştırılması. *DOĞA, TU Vet. ve Hay. Derg.*, 11: 72-85, 1987.
- 53- Thadepalli, H., Gollapudi, S.V.S., and Chuah, S.K.: Therapeutic evaluation of Difloxacin (A-56519) and A-56620 for experimentally induced *Bacteroides fragilis*-associated intra-abdominal abscess. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 30: 574-576, 1986.
- 54- Traub, W.H.: The susceptibility of *Clostridium perfringens* Type A to Cephalosporin C antibiotics in vitro. *Chemotherapy* 16: 11-17, 1971.
- 55- Traub, W.H. , and Sherris J.C.: The susceptibility of *Clostridium perfringens* Type A to Ampicillin and Penicillin G in Vitro. *Chemother.* 13: 303-309, 1968.
- 56- Witesky, F.G., MacLowry, J.D., and French, S.S.: Broth dilution minimum inhibitory concentrations: Rationale for use of selected antimicrobial concentrations. *J. Clin. Microbiol.*, 9: 589-595, 1979.

TEŐEKKÜR

Bu tez çalıŐmasını uyarı ve destekler ile yönlendiren danıŐmanım Sayın Dr. Asuman Berkoğlu'na, çalıŐmalarımın yürütülmesinde yakın ilgi, uyarı ve desteklerini esirgemeyen Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Antibiyogram ve Antibiyotik Disk retim Laboratuvarı Őefi Sayın Uzm. Vet. Hek. Nedret Aydın'a, Teşhis Laboratuvarı Őefi Sayın Uzm. Vet. Hek. Muhsin Bekar'a, çalıŐmalarımın yürütülmesinde yardımcı olan Antibiyogram ve Antibiyotik Disk retim Laboratuvarı ve Teşhis Laboratuvarı Teknisyenlerine ve personeline teŐekkür ederim.