

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN KÜLTÜRÜNDE ÜREYEN BRUCELLA'LARIN TIPLENDİRİLMESİ VE
ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Gani ORHAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. İclal BALCI

Gaziantep,2003

GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN KÜLTÜRÜNDE ÜREYEN BRUCELLA'LARIN TİPLENDİRİLMESİ VE
ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Gani ORHAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. İclal BALCI

Gaziantep,2003

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I. TEŞEKKÜR	V
II. TABLOLARIN LİSTESİ	VI
III. GRAFİKLERİN LİSTESİ	VIII
IV. RESİMLERİN LİSTESİ	IX
V. KISALTMALARIN LİSTESİ	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe ve Konak Özellikleri	3
2.2. Görünüm ve Boyanma Özellikleri	5
2.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri	5
2.4. Klinik	6
2.5. Patogenez ve Patoloji	7
2.6. Tanı	9
2.7. Bakteriyolojik Tanı	11
2.8. Bruselloz Tanısında Kullanılan Serolojik Yöntemler	12
2.8.1. Standart Tüp Aglütinasyonu (Wright Deneyi)	12
2.8.2. Rose Bengal Testi	12
2.8.3. Tam Kan Kullanılarak Yapılan Lam Aglütinasyon Deneyi (Spot Test)	12
2.8.4. Brusella Coombs Testi	12
2.8.5. 2-Mercapto Ethanol ve Diamino 6,9 Etoxy acridin (Rivanol) li Aglütinasyon Deneyi	13
2.8.6. Kompleman Birleşmesi Deneyi	13
2.8.7. İndirekt Hemaglütinasyon Testi	13
2.8.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	13

2.8.9. Radyoaktif immün Deneş ve Enzim İşaretli İmmün Deneş	13
2.8.10. Hayvan Deneşleri	13
2.9. Allerjik Tanı	14
2.10. Tiplendirme	14
2.10.1. Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ön tiplendirme	14
2.10.2. Referans Laboratuvarlarında Biyovar ve Biyotiplerin Tayini	14
2.10.3. Biyovar ve Biyotip Tayinindeki Başlıca Kriterler	15
2.10.4. CO ₂ Gereksinimleri	15
2.10.5. H ₂ S Oluşturmaları	15
2.10.6. Üreaz Aktiviteleri	15
2.10.7. Tiyonin ve Bazik Fuksin İçeren besiyerlerinde Üreme	15
2.10.8. Monospesifik Serumlarla Aglutinasyon	16
2.11. Faj Tiplemesi	16
2.12. Korunma ve Aşı Çalışmaları	16
2.13. <i>Brucella</i> Bakterilerinin Antibiyotik Duyarlılıkları ve Antibiyotik Kombinasyonlarının bu Bakterilere Etkileri	18
2.13.1. Mikrodilüsyon Dama Tahtası (Checkerboard yöntemi)	19
2.13.2. Makrodilüsyon Dama Tahtası (Checkerboard yöntemi)	20
2.13.3. Agar Dilüsyon Dama Tahtası (Checkerboard yöntemi)	20
2.13.4. Zamana Bağlı Ölüm (Time-Kill) yöntemi	20
2.13.5. Disk Diffüzyon Yöntemi	20
2.13.5.a. Tek Disk Difüzyon Yöntemi	20
2.13.5.b. Çift Disk Diffüzyon Yöntemi	20
2.13.6. E-test	21
2.14. <i>Brucella</i> Bakterileri İçin Önerilen Uygun Duyarlılık Yöntemleri	21
2.15. Tedavi	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. İzolasyon ve Örneklerin İşleme Alınması	25

3.2. Bakteri Suşları	25
3.3. Duyarlılık Testleri ve Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkisinin Araştırılması	26
3.3.1. E-Test	27
3.3.2. İstatistik	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇLAR	59
7. ÖZET	61
8. ABSTRACT	62
9. KAYNAKLAR	63

I. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim sürem boyunca ve tez çalışmalarında bilgi, görüş ve eleştirileriyle bana yol gösteren, yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. İclal BALCI'ya, yardım ve katkılarından dolayı değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Tekin KARSLIGİL'e, istatistik çalışmalarında önerilerinden büyük fayda gördüğüm Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Saime ŞAHİNÖZ'e, çalışma arkadaşlarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım.

II. TABLOLARIN LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. <i>Brucella</i> Bakterileri Arasındaki Ayrılıklar	6
Tablo 2. Tutulan sistem ve dokular	7
Tablo 3. Kullanılan şişelerin içerikleri	11
Tablo 4. <i>Brucella</i> 'ların Ayırtıcı Özellikleri	17
Tablo 5. Antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğini ölçen invitro testler	19
Tablo 6. FİK değerlerinin hesaplanması	22
Tablo 7. Çalışmaya ait istatistiksel değerler	28
Tablo 8. <i>Brucella</i> üreyen örneklerin yıllara ve servislere göre dağılımı	29
Tablo 9. <i>Brucella</i> suşlarının izole edildiği klinik örneklerin dağılımı	30
Tablo 10. İzole edilen örneklerin aylara göre dağılımı	30
Tablo 11. Tek tek antibiyotiklerin oluşturdukları MİK değerleri	31
Tablo 12. RİF + DOX Kombinasyonun MİK Değerleri	32
Tablo 13. RİF + TMP-SXT Kombinasyonun MİK Değerleri	32
Tablo 14. TMP-SXT + DOX Kombinasyonun MİK Değerleri	33
Tablo 15. SM + DOX Kombinasyonun MİK Değerleri	33
Tablo 16. AZ + SİP Kombinasyonun MİK Değerleri	34
Tablo 17. RİF + DOX Kombinasyonun FİK Değerleri	35
Tablo 18. RİF + TMP-SXT Kombinasyonun FİK Değerleri	37
Tablo 19. TMP-SXT + DOX Kombinasyonun FİK Değerleri	39
Tablo 20. SM + DOX Kombinasyonun FİK Değerleri	41
Tablo 21. AZ + SİP Kombinasyonun FİK Değerleri	43
Tablo 22. Tüm kombinasyonların FİK index yüzdeleri ve yorumları	45
Tablo 23. Rifampisin ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK Değerleri	52

Tablo 24.	Doksisiklin ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK Değerleri	53
Tablo 25.	Trimetoprim/sülfometaksazol ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK Değerleri	54
Tablo 26.	Streptomisin ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK Değerleri	55
Tablo 27.	Azitromisin ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK Değerleri	56
Tablo 28.	Siprofloksasin ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK Değerleri	57

III. GRAFİKLERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Grafik 1. İstatistik değerlerin grafikleri	28
Grafik 2. RİF + DOX Kombinasyonunun MİK Değerleri	46
Grafik 3. RİF + TMP-SXT Kombinasyonunun MİK Değerleri	46
Grafik 4. TMP-SXT + DOX Kombinasyonunun MİK Değerleri	47
Grafik 5. SM + DOX Kombinasyonunun MİK Değerleri	47
Grafik 6. AZ + SİP Kombinasyonun oluşturduğu MİK Değerleri	48
Grafik 7. Beş Kombinasyonun oluşturduğu MİK Değerleri	48

IV. RESİMLERİN LİSTESİ

		<u>Sayfa</u>
Resim 1.	Koyun kanlı besiyerinde <i>Brucella</i> kolonilerinin görünümü	26
Resim 2.	İnkübasyondan sonra oluşan zonların görünümü	27

V. KISALTMALARIN LİSTESİ

RES	Retikülo Endotelial Sistem
EMB	Eosin Metilen Blue
STA	Standart Tüp Aglütinasyonu
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
LPS	Lipopolisakkarit
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIA	Radio İmmün Assay
ELISA	Enzym Linked İmmün Sorbent Assay
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
FK	Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon
ΣFK	Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksi
S	Sinerji
A	Antagonizma
I	İndiferens
PS	Parsiyel Sinerji
RİF	Rifampisin
DOX	Doksisiklin
TMP-SXT	Trimetoprim/Sulfometaksazol
SM	Streptomisin
AZ	Azitromisin
SİP	Siprofloksasin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bruselloz ciddi ekonomik kayıplara neden olmanın yanı sıra, gelişmekte olan ülkelerde halen önemli bir sağlık sorunu olup, hayvanlardan bulaşan bir zoonozdur (1,2). Hastalık insanlarda fizik yetersizliğe ve iş gücü kaybına neden olmaktadır. Bruselloz bir yandan da hastalığın esas kaynağını oluşturan evcil hayvanlarda süt verimini azaltırken, hayvan düşükleri ile ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bazı gelişmiş ülkelerde bruselloz hayvanlar arasında tamamen eradike edilmiş olmakla birlikte, ülkemizde hayvanlar arasında oldukça yaygın bir hastalıktır. Özellikle Gaziantep ilinin de içerisinde bulunduğu Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaygındır. *Brucella* taşıyan hayvanların yaygınlığı, kontrol tedbirlerinin yeterli uygulanamadığı ve komşu ülkelerden kontrolsüz hayvan girişinin engellenemediği bölgemizde, sosyokültürel ve ekonomik olumsuzluklardan dolayı infeksiyon önlenememektedir (3,4).

Sağlık Bakanlığı verilerine göre bruselloz vakalarında yıllar içerisinde belirgin artış vardır (5). Dünyada yaklaşık her yıl 500.000 civarında yeni olgu bildirilmektedir (7). Bu çalışmada kan kültüründe üreyen 49 suştan 44'ünün tiplendirilerek bu suşlara antimikrobiyal duyarlılıkları E-test ile araştırıldı.

Brucella bakterileri intrasellüler yerleşim gösterdikleri için tedavide hücre içine yüksek konsantrasyonda girebilen antibiyotikler seçilmeli ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün önerdiği şekilde ikili, bazı durumlarda üçlü kombine antibiyotik uygulanması şeklinde olmalıdır. Tedavideki yetersizlik ve nüksler, kullanılan antibiyotiklerle ilgili bazı zorluklar, bruselloz tedavisinde yeni arayışlara yol açmıştır (1,8,9).

Amacım bu çalışmada, kan kültüründe üretilen *brucella* suşlarını tiplendirerek, ülkemizde ve hastanemizde önemini koruyan brusellozun tedavisine ışık tutmak, özellikle çalışılmadığını düşündüğüm azitromisin+siprofloksasin (AZT+SİP)

kombinasyonu ve hücre içine iyi penetre olabilen çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının *Brucella* bakterilerine karşı etkilerini E-Test ile araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Bruselloz, Akdeniz ülkeleri ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur (1). Temelde bir hayvan hastalığı olan bruselloz , koyun , keçi , sığır, manda, domuz gibi hayvanların etleri, sütleri, infekte gebelik materyalleri, infekte sütlerden hazırlanan süt ürünlerinden bulaşan, titreme ile yükselen ateş, kas ve büyük eklem ağrıları ile seyreden bir zoonozdur. Bakteri hayvanlarda sterilite ve düşüklere, insanlarda başlangıçta septisemi ile seyreden, sonraları kronikleşerek çeşitli organlarda (kemik dokusu ve diğer bir çok organda) lokalize infeksiyonlara neden olur (1, 10-12).

2.1. Tarihçe ve Konak Özellikleri

Hastalık ilk olarak Hipokrates tarafından 'humma' olarak tanımlanmıştır (11). Bruselloz, Malta ateşi, Dalgah ateş ve Bang ismi ile de adlandırılır (12).

Brucella melitensis, hastalık etkeni olarak 1886'da ilk defa Bruce tarafından 'Malta Humması' nedeniyle ölen insanların dalak pulpasından izole edilmiş ve *Micrococcus melitensis* olarak adlandırmıştır . Sonraları bu bakterinin sağlıklı keçilerin, bazen ineklerin süt ve idrarında bulunduğu , 1904 yılında süt ve idrardan adı geçen bakterinin izole edilmesi ile ortaya konmuştur (11,12).

Ülkemizde ilk kez 1915 yılında Kuleli Askeri hastanesinde bir erde Hüsamettin Kural ve Mahmut S. Akalın tarafından *B. melitensis*, 1931'de sığırlardan Zühtü Berke; koyun ve keçilerden 1943'de Golem, 1944'de ise Köylüoğlu ve Aktan *Brucella* cinsi bakterileri bulmuşlardır . *B. melitensis* esasen keçi ve koyunları enfekte etmekle birlikte sığır ve domuzlarında infekte edebilir. *B.melitensis* infekte ettiği hayvanlarda retiküloendotelial sistem (RES) ve genital yollara yerleşmekte ve gebe hayvanlarda

düşüklere neden olmaktadır. Hastalık her yaş ve cinsde özellikle de 15-35 yaş grubunda görülür (1,11,12).

Brucella abortus, Bang tarafından 1895 yılında, Danimarka'da doğum yapan sığırların uterus duvarı salgılarından izole edilmiştir (1). *B. abortus* en çok sığır, sonra sırayla domuz, keçi ve koyunlarda hastalık oluşturur. *B. melitensis*'e göre daha az virulandır ve insanlarda da infeksiyon oluşturmaktadır (1).

Brucella suis, esasen domuzların patojeni olan *B.suis*, Traum tarafından 1914 yılında premature doğum yapan domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden izole edilmiştir (11). İnfeksiyon diğer hayvanlara da geçebilir, fakat bu geçiş *B. abortus* ve *B. melitensis*'e göre daha nadirdir (1).

Brucella ovis, Bu tür 1953'te Avustralya 'da Boddle, Yeni Zelanda'da ise Simmons ve Hall tarafından koçlar arasında seksüel yolla bulaşan epididimit olgularından izole edilmiştir. Dişilerin düşük yapmasına ve doğan kuzularda ölümlere neden olmaktadır (1).

Brucella neotomae, Bu tür Stoenner ve Lackman tarafından 1957'de ABD'de Utah eyaletinde çöl sıçanlarından izole edilmiştir (1).

Brucella canis, Carmichael ve Bruner 1968'de ABD'de küçük av köpeklerinden düşük nedeni olarak *B. canis*'i izole etmiştir (1). İnsanda ilk kez 1977'de , bir kadın hastadan saptanmıştır (12).

Brucella rangiferi tarandi, Rusya ve Alaska'da ren geyiklerinden izole edilmiştir (12).

Brucella maris, 1994 yılında İskoçya kıyılarında deniz memelilerinin ölülerinde ve Kaliforniya'da yunus balıklarından daha önceden bilinmeyen farklı özellikte *Brucella* cinsi bir bakteri izole edildi ve buna *B. maris* adı verildi (1).

2.2. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Brucella bakterileri küçük, hareketsiz, sporsuz, kirpiksiz, gram negatif kok, kokobasil ve kısa çomaklar halinde olup, kenarları hafif konveks ve uçları yuvarlaktır (1). Çomaklar genelde tek veya ikişer ikişer durma alışkanlığındadır. Bu durumları ile diplokoklara benzerler. Bazen sıvı besiyerlerinde 3-5'li zincirler yapabilirler. Boyutları

0.6-1.5 µm dir. Küçük olduklarından moleküler hareket ile yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). Organizmadan yeni ayrıldıkları zaman S tipi kolonilerde ince bir kapsüllerinin bulunduğu saptanır. Pasajlarda ve R tipi kolonilerde bu kapsül kaybolur. *Brucella*'lar bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar. Gram boyamada zıt boyayı güç aldıklarından, bu boya ile en az 3 dakika tutulmalıdır (13).

Brucella bakterilerinin ince yapısı diğer gram negatif bakterilere benzemekle birlikte, Enterobakterilerden *Escherichia coli* (E.coli) ile kıyaslandığında bazı farklar göstermektedir. *Brucella*'ların dış membranlarında porinler, grup 3 proteinler ve peptidoglikana kovalan olarak bağlanmış lipoproteinler olmak üzere üç tip protein vardır. En dışta 9 nm kalınlığında lipopolisakkarit (LPS) tabaka ve dış yüzeyde polisakkarit zincirler bulunur. Bu bölge S ve R koloni yapan bakterilerin major antijenlerinin yerleşim yeridir. Lipopolisakkarit protein tabaka 3-5 nm kalınlığında olup elektron yoğun muramik asit içeren peptidoglikan tabakasına iç katmanda bağlıdır. Bu kat *Brucella*'larda *E.coli*'ye göre daha kalındır. Daha içte S hücrelerde 3-6 nm ve R hücrelerde 30 nm kalınlığında yoğunluğu düşük periplazmik aralık vardır. Sitoplazmik membran tipik üç katlı proteindir. Sitoplazmaları oldukça homojen olup içlerinde küçük vakuol ve polisakkarit içeren granüller vardır. *Brucella*'larda DNA'daki G+C oranı % 56-58 dir (1,13,14).

2.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Brucella'lar aéroptur. Organizmadan yeni ayrıldıklarında besiyerlerinde yavaş ürerler. Özellikle *B.abortus* ilk izolasyonunda % 5-10 CO₂'li ortama gereksinim duyar (1).

Genellikle ilk izolasyonda geç ürerler, bilhassa ilk izolasyonda zengin besiyerlerinin kullanılması gerekir. İntrasellüler yaşadıklarından beslenme ihtiyaçları karışıktır. Et özeti, triptozdan zengin peptonlu, glikoz ve tuz içeren besiyerlerinde iyi ürerler. Bazı türler için tiamin, niasin, nikotinic asit, vitaminler ve biotin, bazen serum gerekebilir. Kalsiyum pentenat ve mezoeritritol üremelerini artırır. Optimal üreme ısısı 37°C olmakla birlikte 10-40°C'de üreyebilir. Üremeleri için optimal pH: 6,8-7 olmalıdır. İnkübasyondan 2-3 gün sonra koloniler görülebilir. İlk izolasyondan sonra buyyon ve jeloz gibi basit besiyerlerinde üremeye alışırlar (13).

Jelozdaki koloniler küçük, yuvarlak, kabarık, saydam, şebnem tanesine benzeyen kaygan ve S tipindedirler. Pigment yapmazlar. *B. melitensis* ve bir kısım *B. abortus* kökenlerinin kolonileri zamanla esmer-kahverengi bir renk alırlar. Eski kültürlerde R kolonileri oluşur. Karbonhidratlardan asit veya gaz yapmamakla beraber glikozu az miktarda redükte ederler. Nitratları redükte ederler. Sütte hafif alkali reaksiyon yaparlar, Jelatini eritmezler ve indol oluşturmazlar (13). Katalaz pozitif olup, *B. ovis* ve *B. neotomae* dışında da oksidaz pozitifdir. (14). Tablo 1'de *Brucella* bakterileri arasındaki farklılıklar gösterilmiştir.

Tablo 1. *Brucella* bakterileri arasındaki ayrılıklar

	Tiyonin 1/50.000	Bazık füksin 1/25.000	Metil viyole 1/50.000	Pironin 1/100.000	Inozitol	Maltoz	Mannoz	Ramnoz	Trehaloz	CO ₂ ye ihtiyaç	H ₂ S teşhili	Üreyi hidroliz
<i>B. melitensis</i>	Ürer	Ürer	Ürer	Ürer	-	-	-	-	-	yok	1 gün	- +
<i>B. abortus</i>	Üremez	Ürer	Ürer	Ürer	+	-	+	+	-	var	2 gün	- +
<i>B. suis</i>	Ürer	Üremez	Üremez	Üremez	-	+	+	-	+	yok	3-5 gün	++

Brucella'lar çoğu kez ısıya, asitlere ve dezenfektanlara dirençli değildir. Sütün pastörizasyonu ile ölürlü (13).

2.4. Klinik

Brusellozun semptomları nonspesifiktir. Hastalığın inkübasyon süresi 2-4 hafta arasında değişmektedir. Klasik olarak titreme ile yükselen ateş, terleme, iştahsızlık, kilo kaybı, yaygın vücut ağrıları ile kendini gösteren bir infeksiyon hastalığıdır. Tüm bu genel belirtilere ek olarak her hastada değişebilen farklı klinik tablolar görülebilir (1,15). Ateş özellikle *B. melitensis* infeksiyonlarında 10-15 gün 38°-39° C, bazen daha yükseğe çıkar ve sonra yine basamak basamak iner, iki hafta içinde normal değere gelir.

3-5 bazen 10 günlük ateşsiz dönemden sonra yeni bir dalga şeklinde tekrarlar (ondulan tipte ateş). Ateşsiz dönemde hasta kendini iyi hisseder (12,13).

Dalak orta derecede ele gelir, lenfadenomegali, bazen hepatomegali ile beraber sarılıkla seyreden hepatit gelişir. Merkezi sinir sistemine yerleşmesi sonucu ensefalit, miyelit, menenjit oluşturdukları görülmüştür. Ayrıca osteomyelit, artrit, pnomoni, plörezi, bronşit, endokardit, flebit, gibi klinik yerleşimler saptanabilir.

Hastalar hekime; sepsisemi şeklinde akut belirtilerle, subakut veya fokal odak belirtileri ya da tüberküloza benzeyen lenfogradümatöz tipte kronik belirtilerle başvurabilir. Tablo 2’de tutulan sistem ve dokuların görülme oranları verilmiştir (16).

Tablo 2. Tutulan sistem ve dokular

Klinik Bulgular	Görülme oranı (%)
Gastro-intestinal sistem	70
Kas iskelet sistemi	20-40
Sinir sistemi	5-70
Kardiyovasküler sistem	1-5
Respiratuvar sistem	15-25
Genitoüriner sistem	2-15
Hemopoetik sistem	30-70
Cilt tutulumu	5

2.5. Patogenez ve Patoloji

Bruselloz dünyada oldukça yaygındır. Koyun ve keçinin yetiştirildiği bölgelerde *B. melitensis*, sığırcılığın yaygın olduğu bölgelerde ise *B. abortus* infeksiyonlarına sık rastlanmaktadır. Veterinerler, mikrobiyologlar, çobanlar, çiftçiler, laboratuvar çalışanları ve kasaplar bruselloz yönünden risk altındadır (1,11-13,17,18).

İnsan infeksiyonları, infekte hayvanların bakımları, kesimleri sırasında veya infekte hayvanın kontamine sütü veya süt ürünlerinin yenmesi ile bulaşır. Ülkemizde en çok çiğ süttten yapılmış taze peynir ve krema ile bulaşmaktadır. Özellikle kırsal kesimlerde bazı yörelerde yaz aylarında sütlerin kaynatılmadan peynir mayaları ile mayalanması sonucu elde edilen taze tuzsuz peynirlerin tüketilmesi, bulaş için büyük risk taşımaktadır (19). Direkt temasla hayvanın genital akıntısı, düşük materyali veya plasenta gibi hayvana ait kontamine materyalin hasarlı ciltle veya konjunktival yolla teması sonucu bulaş olabilir (1,5,11,12,14). Laboratuvar ortamından direkt inokülasyon yada inhalasyon yolu ile bulaş bildirilmiştir. İnsandan insana bulaşma çok ender rastlanılan bir olaydır. *Brucella* bakterisi ile infekte iki laboratuvar personelinin birisinin eşinde, diğerinin nişanlığında bruselloz tesbit edilmiştir (11). Ayrıca bruselloz'lu bir hastadan yapılan kemik iliği transplantasyonu ile ve brusellozlu bir ammenin süt verdiği çocuğunda bruselloz bildirilmiştir (5,11,19).

Etken vücuda, sindirim yolundan, deri çatlaklarından, bakteri ile kontamine aerosollerin solunması ile hava yolundan veya konjunktival yolla organizmaya girmekle birlikte, en sık sindirim yolu ile girmektedir (11,12). Alman gıdaların alkali olması barsağa bakterinin geçişini hızlandırır (1). Bakteri ilk evrede vücuda girince ekstrasellüler olarak replike olur ve kan yolu ile dalak, karaciğer, kemik iliği, kemik, eklem, böbrek, merkezi sinir sistemi (MSS), endokard, akciğer, periton, testis ve over gibi organlara yerleşir (12).

Kuluçka süresi 1-3 hafta arasında değişirse de, bazen 6 veya 7 haftayı bulmaktadır. Bruselloz ateş, terleme baş ağrısı, kırıklık halsizlik, kilo kaybı, artrit, bel ağrısı ve yaygın vücut ağrıları ile kendini gösteren bir infeksiyon hastalığıdır. Klinik belirtiler hastalara göre değişebilir. Brusellozda karaciğer hemen daima tutulmakla birlikte, karaciğer fonksiyon testlerindeki yükselme genellikle düşük düzeydedir (11,12,15).

Bakterinin fagositozundan polimorf nükleer lökositler ve makrofaj hücreleri sorumludur. Endositoz ile fagosit edilen bakterinin % 99'u ilk 12 saatte yok edilirken, kalan % 1'i ilk 8-12 saatte hızla çoğalmaya başlar. Salgılanan IL-1 ateş, titreme, nötrofil adezyonundan, IL-4 kaşeksi ve B hücre cevabından, TNF- α ise ateş, kaşeksi, granülasyon oluşumu ve makrofaj fonksiyonundan sorumludur. İnfeksiyon cevabında gama interferon hücre içinde demirin aktifleşmesine yardımcı olur. Diğer bakteriyel infeksiyonlarda fagositozda nitrik oksit önemli iken brusellozda Fe iyonları anlamlıdır.

Hastalığın 2. evresi bakterinin RES'e yerleştiği, CD4 ve CD8 hücrel cevap ile birlikte antikor oluşumunun başladığı evredir. Bu evrede granülasyon ve bakterinin organ yerleşimleri olur. Hastalığın 3 ve 4 . evresinde hücrel temizlenme olmadığı için hastalığın relaps ve komplikasyonları görülebilir. *B. melitensis*'de relaps daha sık iken *B. abortus*'da tedaviye cevap iyidir (12,16,20).

İnsan brusellozunda immun yanıt sonucu başlangıçta IgM titresi yükselmekte ve bunu birkaç hafta içerisinde IgG sınıfından antikorların sentezi izlemektedir. Tedaviden sonra IgM ve IgG seviyeleri düşmekte ve özellikle IgG seviyesindeki düşüş tedaviye olan cevabı göstermektedir. IgG seviyesindeki yükselme, tam olmayan iyileşme veya relapsa işaret eder (12,16,21).

2.6. Tanı

Dikkatli bir anemnez bruselloz tanısının konulmasına yardımcı olmakla birlikte, laboratuvar bulguları tanı için büyük önem taşır. Sistemik brusellozda ilk atakta tanı koymak nispeten kolay ise de nökslerde, kronik brusellozda ve eskiden komplikasyon olarak adlandırılan, fakat yeni anlayışa göre brusellozun değişik formları şeklinde nitelenen menenjit, spondilit, epididimit, orşit gibi tablolarda tanıya ulaşmak son derece güçtür. Bundan dolayı brusellozda kesin tanı ancak laboratuara dayanılarak konulmalıdır. Brusellozdan kuşkulandığında çok sayıda kan kültürü alınmalıdır (1,13,14,22).

Buna rağmen etkenin izolasyonu her zaman mümkün olmamaktadır. Buna neden olarak; hastanın antibiyotik kullanması, kandaki bakteri sayısının düşük olması gibi faktörler ileri sürülmektedir. Antibiyotik kullanmışlarda kan kültürü ile % 50 olan izolasyon oranı, kemik iliği kültürü ile % 90'a ulaşmakta; antibiyotik kullanmayanlarda kan kültürü ile izolasyon oranı % 75, kemik iliği kültüründe ise bu oran % 92.5'e yükselmektedir (12). Akut belirtilerle başvuran hastalarda, etkenin izolasyonu için yapılacak olan kan kültürlerinin her seferinde çift alınması ve bir tanesinin % 10 CO₂'li ortama konulmasında fayda vardır. Özellikle kronik bruselloz vakalarında kan kültürleri her zaman olumlu sonuç vermeyebilir; böyle kronik ve subakut bruselloz vakalarında etkenin üretilmesi için kemik iliği kültürü önerilir (12).

MSS tutulumu düşünülen bruselloz vakalarında BOS'dan, hepatit belirtileri ile seyreden vakalarda ise karaciğerden alınan biyopsi örneklerinden yapılan kültürlerde

bakteriyeyi üretme olasılığı vardır (12,14). Ancak bu işlem invaziv girişim gerektirdiğinden tercih edilmeyen bir yöntemdir.

Kan ve diğer vücut sıvılarının kültürü için eskiden, aynı şişede sıvı ve katı besiyerleri bulunan Castaneda besiyeri önerilmekteydi. Castaneda şişeleri %5-10 CO₂'li ortamda en az 30 gün enkübe edilip ve 4-5 günde bir subkültürleri yapılmaktaydı. Katı besiyerindeki kültürler 35-37 °C'de % 5-10 CO₂'li ortamda 10 gün enkübe edilir. Dört-beş gün sonra 2-3 mm çapında *Brucella* bakterileri oluşur (13). Ancak günümüzde laboratuvar tekniklerindeki hızlı gelişmeler sonunda daha hızlı sonuç veren otomatize sistemler geliştirilmiş olup, bu yöntemle 3-5 günde sonuç alınabilmektedir. Bu yöntemlerden birisi de BACTEC sistemidir (1,22-27).

Bizim kullandığımız BACTEC 9120 sisteminde, kan kültürü şişelerinin içine konduğu kuyucuklar da 35°C'de devamlı çalkalanmaktadır. Sürekli otomatik olarak alet tarafından şişe içinde üreyen bakterinin metabolizması sonucu ortaya çıkan CO₂ miktarı okunmakta ve yükselen değerde şişe pozitif sinyal vermektedir. Bu şişeden steril şartlarda 3 cc kan alınmakta ve 3000 devirde santrifüj edilmekte dipteki çökeltiden % 5 koyun kanlı Mueller-Hinton Agar, eozin metilen blue (EMB) agar besiyerlerine pasajı yapılmaktadır.

Bactec sisteminde kullanılan şişeler

- BACTEC PLUS Aerobic/F
- BACTEC PLUS Anaerobic/F
- BACTEC PEDS PLUS/F

Kullanılan şişelerin içerikleri Tablo 3.'de gösterilmiştir.

Kontamine materyal ekiminde katı, plak şeklinde selektif besiyeri kullanılmalıdır. Bu plakların yüzeylerinin tam kuru olmaları büyük önem taşır. Nemli ortam *Brucella*'ların varyasyonlarına yol açtığından bu plaklar bir gece 37°C'de kapaklarında kurutma kağıdı olarak ya da 1 saat kapakları aralık olarak kurutulmalıdır (13). Şişelerin içerikleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo- 3. Kullanılan şişelerin içerikleri

	BACTEC PLUS Aerobic/F	BACTEC PLUS Anaerobic	BACTEC PEDS PLUS
Liquid	25 ml	25 ml	40 ml
Soybean-Casein Digest B.	2.75% w/v	2.75 w/v	2.75 w/v
Yeast Extract	0.25% w/v	0.4% w/v	0.25% w/v
Animal Tissue Digest	-	0.05% w/v	0.10% w/v
Dextrose	0.06% w/v	0.25% w/v	0.06% w/v
Sucrose	0.084% w/v	-	0.08% w/v
Fructose	-	0.25% w/v	-
Arginine	-	0.25% w/v	-
Hemin	0.0005% w/v	0.0005% w/v	0.0005% w/v
Menadione	0.00005% w/v	0.0005%w/v	0.00005%w/v
Pyridoxal HCl	0.001%w/v	-	0.001%w/v
Thiols	-	0.16%w/v	-
Sodium Citrate	-	0.02%w/v	-
Potassium Phosphate	-	0.24%w/v	-
SBS	0.05%w/v	0.05%w/v	0.020%w/v
Nonionic Adsorbing Resin	16.0%w/v	16.0%w/v	10.0%w/v
Cationic Exchange Resin	1.0%w/v	1.0%w/v	0.6%w/v

SBS: Sodium Polyanetholesulfonate

Bütün BACTEC şişelerine CO₂ ilave edilir. Anaerobiklere ilaveten N₂ eklenir.

2.7. Bakteriyolojik Tanı

Bakterinin hemen tüm vücutta ve intrasellüler bulunuşu tanıma güçlüğüne yol açmaktadır. Brusellozlu olgulardan bakterinin izolasyonu güç olduğundan ve zaman aldığından, hastalığın rutin tanısında serolojik testlerden yararlanılmaktadır (4).

Hastanın öyküsü, epidemiyolojik özellikleri ve klinik bulgular serolojik testlerle birlikte değerlendirilmelidir. Aglütininler IgG ve IgM yapısında olup hastaların kanında

2. haftadan itibaren ortaya çıkarlar ve hastalık geçtikten sonra bile kanda saptanabilirler (4,12,21).

Brusellozun endemik olduğu bölgelerde popülasyonun %5-10'unda hastalık olmaksızın aglütinasyon titresi 1/80-1/160 olabilmektedir. Bu amaçla Standart tüp aglütinasyon testi (STA) en sık kullanılan testtir. Antijen hazırlamak için antijenik stabilitesi bulunan özel *Brucella* kökenleri kullanılır. Bu gün en çok kullanılan standart kökenler *B. abortus* S 99 ve *B. abortus* 1119 kökenleridir (4,12,21).

2.8. Bruselloz Tanısında Kullanılan Serolojik Yöntemler

2.8.1. Standart Tüp Aglütinasyonu (Wright Deneyi): *Brucella* bakterileri hızlı antijenik yapı değiştirdiklerinden deneyde antijen olarak standart, iyi aglütinasyon veren kökenlerin S kolonilerinden üretilmiş, ısı ile öldürülmüş, fenollü bakteri süspansiyonları kullanılır. STA'da hasta serumlarının katlı seri dilüsyonları yapılır. Üzerlerine eşit miktarlarda *Brucella* antijeni konur. Yirmidört saat 37°C'de inkübasyondan sonra, aglütinasyonun tüpün dibinde yaygın bir kümeleşme şeklinde görülmesi pozitif olarak kabul edilir (11,12,14,21).

2.8.2 Rose Bengal Testi: Küçük sağlık birimlerinde veya polikliniklerde . bruselloz tanısının kısa sürede konulmasını sağlayan, *B. abortus* 99S suşunun boyalı antijen olarak kullanıldığı bir lam aglütinasyon testidir. Lam üzerine 0,003 ml antijen ve aynı miktarda serum konularak 4 dakika süre ile karıştırılıp aglütinasyon olup olmadığı değerlendirilir. Tarama testi olarak kullanılır (11,12,21).

2.8.3. Tam Kan kullanılarak Yapılan Lam Aglütinasyon Deneyi (Spot Test): Özellikle kitle taramalarında yoğun *Brucella* bakteri süspansiyonundan özel olarak hazırlanmış antijenin bir damlası üzerine tam kan damlatıldığında olumlu olgularda aglütinasyon görülür (21).

2.8.4. Brusella Coombs Testi: Bazı subakut bruselloz olgularında, klinik olarak bruselloz düşünüldüğü halde, STA testinde negatif sonuç alınmaktadır. Bu hastaların serumlarında blokan antikorlar araştırılmalıdır. Bu işlem için, STA testinde

aglutinasyon vermeyen tüplerdeki bakteriler, tuzlu su ile üç kez yıkayıp küçük tüplerde yeniden süspansiyon hazırlandıktan sonra, her tüpün içerisine bir damla Coombs serumu (Anti İnsan Serum Globulini) damlatılır. Tekrar etüvde 24 saat inkübe edilip aynı STA testindeki okuma gibi okunup değerlendirilir (21).

2.8.5. 2-Mercapto Ethanol ve Diamino 6,9 Etoxy acridin (Rivanol) li Aglutinasyon Deneyleri: Olumlu bulunan bir aglutinasyon sonucunun IgM sınıfı antikorlardan mı yoksa hastalığın süregelen olarak devam etmesinden mi olduğunun ayrt edilmesi gerekir. IgG antikorlarının varlığını saptamak için serumdaki IgM tipi antikorların tahrip edilerek aglutinasyon deneylerinin yapılması gerekir. Bu işlem için 2-Mercapto Ethanol ve Rivanol kullanılır. Her ikisi de IgM'deki bisülfid köprülerini kırarak aglutinasyondaki etkinliklerini ortadan kaldırır. Bu işlemi takiben saptanacak pozitiflik IgG ye aittir (21).

2.8.6. Kompleman Birleşmesi Deneyi: Mikro yada makro teknik ile yapılır. IgG yapısındaki tüm antikorlar reaksiyona katıldıklarından Coombs deneyi ile aynı değerde sonuç alınır (13).

2.8.7. İndirekt Hemaglutinasyon Testi: Bakterinin lipopolisakarit (LPS) kısımları ile kaplı, tannik asitle muamele edilmiş koyun eritrositlerinin kullandığı bu testte çözünmüş antijenlerden yararlanır. Çok duyarlı olan bu yöntemde nanogram düzeyindeki IgG'ler saptanabilir (13).

2.8.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) : PCR ile de hızlı bir şekilde *Brucella* bakterilerinin tanısı ve tiplendirmesi yapılabilmektedir (28-30).

2.8.9. Radyoaktif immün deney (RIA) ve Enzim işaretli İmmün deney (ELISA): RIA ve ELISA'da bruselloz tanısında kullanılmaktadır.

2.8.10. Hayvan deneyleri: Bruselloz tanısında hayvan deneyleri de yapılabilir. Doğrudan hasta kanının 5-10 ml.'si kobayların peritonu içine enjekte edilerek yapılır. Bruselloz varsa hayvanlar 2-4 haftada ateş ve septisemi belirtileri ile hastalanır. Gebe

hayvanlar yavrularını düşürür. Bu hayvanlara otopsi yapılırsa kan ve dalaklarından yapılacak preparatlarda *Brucella*'ları görmek mümkündür (21).

2.9. Allerjik Tanı

Bu işlem için bakterilerden elde edilmiş ve saflaştırılmış nukleoprotein kompleksinden oluşan "*Brucellergen*" deri içine enjekte edilir. Bir gün sonra kızartı, ödem ve sertlik şeklinde görülen reaksiyon olumlu olarak kabul edilerek bu kişilerin *Brucella*'lara karşı duyarlı oldukları anlaşılır.

Deri testi için *Brucella*'ların öldürülmüş kültürleri veya 21 günlük kültür süzüntüleri (**Mellitine-Abortin**) ile de yapılır (13).

2.10. Tiplendirme

2.10.1. Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ön Tiplendirme

Glikoz ve laktozu fermente etmeyen, aerob, katalaz ve oksidaz pozitif, Gram negatif, non hemolitik koloniler; Gram boyamada Gram negatif kokobasillerin görülmesiyle absorbe olmamış anti-S *brucella* antiserumu ile lamda aglütinasyon testine tabi tutulur. *Brucella*'ların S suşlarının yüzey antijenleri, *Vibrio cholera*, *Franciella tularensis*, *E. coli* O 157:H7, *Salmonella* O:30 ve *Yersinia enterocolitica* serotip O:9 bakterilerinin yüzey antijenleriyle çapraz reaksiyon verirler (1,11,14).

Kuşkulanılan *Brucella* kolonilerinin temiz bir lam üzerinde , iki ayrı yerde serum fizyolojik ile süspansiyonları yapılır. *B. melitensis* ve *B. abortus* bakterilerine daha önceden hazırlanmış yada ticari olarak temin edilmiş tipe özgül antiserumlarla karşılaştırılır. Koloni ve antiserum süspansiyonunun aglütinasyon verip vermediği kontrol edilir. Hangi antiserumla aglütinasyon verir ise bakteri o antiserumu taşıyan türdür.

2.10.2. Referans Laboratuvarlarında Biyovar ve Biyotiplerin Tayini

B. abortus'un 9, *B. melitensis*'in 3, *B. suis*'in 4 ve diğerlerinin birer biyotipi vardır.

2.10.3. Biyovar ve Biyotip Tayinindeki Başlıca Kriterler

1. CO₂ gereksinimleri
2. H₂S oluşturmaları
3. Üreaz etkinlikleri
4. Tiyonin ve Bazik fuksin içeren boyalı besiyerlerinde üreme
5. Monospesifik serumlarla aglütinasyonları
6. Tb (=Tibilisi) fajına karşı olan duyarlılıkları

Biyovar ve biyotip tayinindeki başlıca testler Tablo 1 ve 4'de gösterilmektedir.

2.10.4. CO₂ Gereksinimleri: Bakteriler iki eğik triptoz agar yüzeyine ekilir. Kültürlerden biri %5-10 CO₂'li ortamda diğeri ise aerop koşullarda inkübe edilir. Aerop koşullarda çok zayıf üreme veya ürememe buna karşılık CO₂'li ortamda üreme bakterilerin CO₂ gereksinimlerini gösterir (13,14).

2.10.5. H₂S Oluşturmaları: Eğik triptoz agar yüzeyine inoküle edilmiş bakterilerle kurşun asetatlı şeritler yüzeye değmeyecek şekilde sarkıtılır. Her gün kağıdın oluşan H₂S etkisi ile siyahlanıp siyahlanmadığı incelenir. Siyahlanma H₂S lehinedir. Siyahlanmış ise kağıt çıkarılıp yenisi ile değiştirilip yeniden enkübe edilir. Bu suretle bakterilerin kaç gün H₂S yaptıkları bulunur. *B. suis* 3 günde, *B. abortus* 2 günde, *B. melitensis* ise 1 günde H₂S yapar (13,14).

2.10.6. Üreaz Aktiviteleri: Hazırlanan üreli jeloz besiyerinde fenol kırmızısı renginin değişme zamanına göre tesbit edilir. *B. abortus* 2 saatten sonra, *B. suis* 15-30 dakikada, *B. melitensis* ise daha çok saatler sonra pembe renk verir (13).

2.10.7. Tiyonin ve Bazik Fuksin İçeren Besiyerlerinde Üreme: Tiyonin (1/100000, 1/50000, 1/25000) ve bazik fuksinin (1/100000, 1/50000) oranlarında boyaları içeren besiyerleri *Brucella* bakterilerinin biyotiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Tiplendirmesi yapılacak *Brucella* bakterisi, bu oranlarda boya içeren plak besiyerlerine çizgi ekimleri yapılarak besiyerlerinin rengini değiştirdikleri zamanlara göre tiplendirme yapılabilir (13).

2.10.8. Monospesifik Serumlarla Aglutinasyon: *B. melitensis* ve *B. abortus* suşları ile hazırlanan monospesifik antiserumlar, hakim olan M ya da A liipopolisakkaritini belirlemede kullanılır. Test bir damla serum fizyolojik ile bakteri kolonisinin temiz bir lam üzerinde karıştırılması ile yapılır

2.11. Faj Tipleme

Faj tipleme özellikle *B. abortus* biyotip 3-6 ve 9'u , *B. melitensis*'ten ayırmakta kullanılmaktadır. Bakteriyofaj Tbilisi rutin test dilüsyonlarında *B. abortus*'un S kültürlerini tamamen eritmekte fakat *B. melitensis* ve *B. suis* bu test dilüsyonlarından etkilenmemektedir. *B. suis*, rutin test dilüsyonunun 10.000 katı konsantrasyonunda kısmen erimesine rağmen, *B. melitensis* bu faj konsantrasyonundan etkilenmez (14).

2.12. Korunma ve aşı çalışmaları

Günümüzde, *B. abortus* 19, *B. melitensis* Rev. I., *B. suis*-2 gibi suşlardan hazırlanan canlı attenüe aşular ve 45/20, H38 gibi ölü *Brucella* aşular kullanılmaktadır. Bu aşular genellikle veterinerlik alanında hayvanlara uygulanmakta olup, insanlar için *Brucella* aşısı konusunda oldukça kısıtlı çalışmalar söz konusudur. İnsanlar için kullanım alanı dar ve koruyuculuğu kısıtlıdır (4).

Tablo 4. *Brucella*'ların Ayırtıcı Özellikleri

Tür	Biyovar	CO ₂ Gerek-Sinmesi	H ₂ S oluşturma	Üreaz Etkinliği	Boyalarda üreme						Aglutinasyon			Tb. fajı erime		En çok duyarlı konak
					Thionin			B. fuchsii			Anti A	Anti M	Anti R	RTD	10.000x RTD	
					a	B	c	b	c							
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	D	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Koyun
	2	-	-	D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Keçi
	3	-	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	İnsan
<i>B. abortus</i>	1	+ -	+	1-2 saat	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	Sığır
	2	+	+	1-2 saat	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	
	3	+ -	+	1-2 saat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
	4	+ -	+	1-2 saat	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
	5	-	-	1-2 saat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
	6	-	+ -	1-2 saat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
	7	-	+ -	1-2 saat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
	8	+	-	1-2 saat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
	9	+ -	+	1-2 saat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
<i>B. suis</i>	1	-	++	0-30 dk.	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	Domuz
	2	-	-	0-30 dk.	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	İnsan
	3	-	-	0-30 dk.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	Ren gey.
	4	-	-	0-30 dk.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	İnsan
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	0-30 dk.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	Neotoma
																Lepida
<i>B. ovis</i>	1	+	-	0	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Koç
	1	-	-	0-30 dk.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Köpek
<i>B. canis</i>	1	-	-	0-30 dk.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	İnsan
																İnsan

a= 1/20.000, b= 1/50.000, c= 0/100.000, A= Mono Sp; abortus serumu, M= Mono Sp. Melitensis serumu, R= Anti R.bruc. serumu Tb= Tbilisi

RTD= Rutin Test Dilüsyon -Boya deneyleri Trypticase soyagar veya Tryptose Agarda yapılmıştır.

2.13. *Brucella* Suşlarında Antibiyotik Duyarlılığı ve Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkileri

Brucella bakterileri RES organlarına (dalak, karaciğer, lenf bezi, kemik iliği) yerleşip çoğalabilen, intrasellüler patojenlerdir. Bu özellikleri antibiyotiklerin etkilerinden korunmalarını sağlar. Tedavide hücre içine iyi penetre olabilen antibiyotikler seçilmekte ve nüksün önlenmesi için tedavi süresi uzun tutulmaktadır. Kabul görmüş tedavi protokollerine rağmen belli oranlarda relaps görülmektedir (1,8,9,12, 31,32).

İn-vitro testlerin sonuçlarına bakıldığında *Brucella* bakterilerinde tedavide kullanılan ilaçların çoğuna direnç görülmemektedir. Hatta relaps sonrası izole edilen bakterilerde, bile tedavide kullanılan ilaçlar tekrar test edildiğinde de yine direnç görülmemektedir (32,33). Relapsın yada tedavideki başarısızlığın sorumlusu olarak bakterilerin hücre içi patojen olmaları düşünülmektedir. Bakteriler fagosite edildikleri makrofaj vb. hücrelerde canlılıklarını sürdürmekte, tedavi amacıyla verilen ilaçlar bu bölgeye ulaşamamakta veya ulaşabilirlerse de bakterileri bazı nedenlerle inhibe edememektedirler. Böylece antibiyotikler uzun süreli verilmediklerinde fagosite edildikleri hücrelerde gizlenen bakteriler bir şekilde açığa çıkıp relaps yada tedavide başarısızlığa neden olmaktadır. Hücre içi lokalizasyonu nedeniyle, brucellozis tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerin şu iki özelliğinin olmasında fayda vardır:

- a) makrofajlar içine penetre olabilmeleri,
- b) hücre içi asidik ortama direnç göstermeleri gerekir (8,31).

DSÖ'nün önerdiği tedavi protokolü streptomisin+doksisiklin ve rifampisin+dosisiklin'dir (1, 8-12,31).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanmakta olan rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile ilgili yöntemler hızlı üreyen, besin gereksinimleri karmaşık olmayan bakterilere göre standardize edilmiş olmakla birlikte, bazı güç üreyen bakterilerden *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*'nin de duyarlılık testleri standardize edilmiştir. Ancak *Brucella* ve *Campylobacter* gibi güç üreyen ve besin gereksinimleri karmaşık olan bakterilerin duyarlılık testleri henüz standardize edilememiştir. Bu bakterilere rutin antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması önerilmemektedir (31-33).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyotik kombinasyonlarının bakteriler üzerine invitro etkileri değişik yöntemlerle yapılabilir (33,34). Invitro sinerji araştırmalarında kullanılan testler Tablo 5'de sınıflandırılmıştır. Bunlar arasında, dilüsyon yöntemleri genel olarak inhibitör etkinlik, zamana bağımlı ölüm incelenmesi ise bakterisidal etkinlik ile ilişkilidir.

Tablo 5. Antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğini ölçen in vitro testler
--

1. Dama tahtası (Checkerboard) Dilüsyon yöntemleri
 - I. Mikrodilüsyon
 - II. Makrodilüsyon
 - III. Agar dilüsyon
2. Zamana bağımlı öldürme kinetiklerinin incelenmesi (Time-kill method)
 - I. Koloni sayımlarının değerlendirilmesi
 - II. Ölüm eğrisi altındaki alanın (Area under killing curve; AUKC) değerlendirilmesi
3. Disk difüzyon yöntemi
 - I. Tek disk difüzyon
 - II. Çift disk difüzyon
4. E-test

2.13.1. Mikrodilüsyon dama tahtası (Checkerboard) yöntemi

Doksan altı çukurlu U tabanlı steril mikrodilüsyon plakları kullanılarak test edilen antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlardaki etkileşimlerinin araştırılmasını temel alan bir testtir. Test edilecek konsantrasyonlar için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin 1/8-1/16 katı ile 4-8 katını içine alacak şekilde iki katlı seri dilüsyonları hazırlanır. Bakteri süspansiyonları yapıp inoküle edildikten sonra 37°C'de 48-72 saat inkübe edilir. Sinerji değerlendirilmesinde kullanılan makro ve mikro dilüsyon yöntemleri, inhibitör ve bakterisidal konsantrasyonların saptanmasında ve antibiyotik duyarlılığın ölçümünde uygulanmakta olan NCCLS buyyon dilüsyon yöntemlerine benzemektedir. Ancak burada antibiyotikler hem tek başlarına hem de diğer ajanlar ile beraber iken etkinlikleri değerlendirilmektedir. İn vitro etkileşimler cebir denklemleri aracılığı ile hesaplanmakta ve buna göre sinerjistik, etkisiz veya antagonistik şeklinde bir sonuca varılmaktadır. Bu yorum için kombinasyon ile elde edilen anti bakteriyel etkililiğin, her antibiyotik tek başına iken saptanan veriler ile kıyaslanması söz konusudur. Bunun yanı sıra in vitro etkileşimler izobologramlar çizilerek grafik üzerinde gösterilebilir (33,34).

2.13.2. Makrodilüsyon dama tahtası (Checkerboard) yöntemi

Mikrodilüsyon plakları yerine tüplerle çalışılan bu yöntemde prensip mikrodilüsyon ile aynıdır. Sakıncası daha büyük hacimlerle çalışılıyor olması, kısıtlı sayıda antibiyotik kombinasyonu ile çalışılması ve MİK değerlerinin yarısı ve iki katı değerde çalışılmasıdır. (33,34).

2.13.3. Agar dilüsyon dama tahtası (Checkerboard) yöntemi

Rutinde çalışılması daha zor bir yöntem olup antibiyotik kombinasyonlarını içeren agar besiyerleri daha önceden hazırlanır. Ekimler nokta şeklinde yapıp antibiyotik etkileşimleri hesaplanır.

2.13.4. Zamana bağlı ölüm (Time-Kill) yöntemi

Antibiyotik kombinasyonlarının zaman ve konsantrasyona bağlı bakterisidal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılır. Çalışılan kombinasyondaki antibiyotiklerin tek tek ve kombinasyon halinde içeren tüpler içine seri dilüsyonları hazırlanarak ekim yapılır ve 24 saat içerisinde belirlenen zaman aralıklarında kantitatif kültürler alınarak koloni sayımı yapılır. Kombinasyonun 24 saatlik koloni sayısında en etkin ilaca kıyasla 100 kattan daha fazla azalma görülmesi sinerji olarak belirlenir. Bu yöntem standardize edilmemiştir. Testin zahmetli ve zaman alıcı olması antibiyotik kombinasyonun sayısını kısıtlar. Zor ve güç üreyen bakterilerde 24 saatlik üremenin yeterli olmaması ise diğer bir önemli dezavantajdır. (33,34).

2.13.5. Disk Difüzyon yöntemi

2.13.5.a. Tek Disk Difüzyon Yöntemi; Kombinasyonlardaki antibiyotiklerden birini bakterinin $\frac{1}{4}$ MİK değerine eşit konsantrasyonda içeren ve antibiyotik içermeyen Mueller Hinton agar besiyerlerine bakteri süspansiyonu ekimi yapılır. Her iki besiyerine de kombinasyonda yer alan diğer antibiyotiğin diskleri yerleştirilir. Bir gece 37°C'de inkübe edilen plaklarda oluşan zonlar ölçülerek aradaki fark kıyaslanır (33,34).

2.13.5.b. Çift Disk Difüzyon Yöntemi; Kirby Bauer yöntemine göre bakteri süspansiyonu %5 koyun kanlı Müller Hinton agar yüzeyine ekim yapıldıktan sonra üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilir. İki gece 37°C'de inkübe edilir. Oluşan zon MİK değerini verir. Antibiyotik diskleri arasındaki mesafe her diskin tek başına oluşturduğu inhibisyon zonunun yarıçapının toplamına eşit ya da daha büyük olmalıdır. Disklerin birbirlerine bakan yüzeylerinde inhibisyon zonunun düzleşmesi antagonizma, genişlemesi sinerjizm, etkileşim saptanmazsa indeferens olarak değerlendirilir (34).

2.13.6. E-Test

E-test yönteminde bir yüzüne bir uçtan diğer uca doğru giderek artan konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş 5x50 mm ebadında, inert, plastik stripler kullanılmaktadır. Stripler üzerindeki mevcut rakamlar ilaç konsantrasyonlarını göstermektedir (35). Yüzde 5 koyun kanlı Mueller Hinton agar yüzeyine bakteri süspansiyonu ekilir. Test edilecek kombinasyonlardan önce bir antibiyotik steril şartlarda plak üzerine yerleştirilir, yarım saat sonra steril pens ile bu strip atılıp yerine kombinasyonun ikinci antibiyotik sribi yerleştirilir.

2.14. *Brucella* bakterileri için önerilen uygun duyarlılık yöntemleri

- Agar dilüsyon
- Buyyonda makro ve mikro dilüsyon
- Mikrodilüsyon dama tahtası (Checkerboard) yöntemi
- E-test

Bu çalışmada duyarlılık testleri için kolay uygulanabilen, ek malzeme gerektirmeyen, MİK değeri tespit edilebilen ve kombinasyon olarak ikili antibiyotik çalışabilen ve son yıllarda rutin kullanılan E-Test yöntemi seçildi (8,31).

E-Test ilk defa 1988 yılında İnterscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)de tanımlanmıştır (35).

E-Test disk diffüzyon yönteminin kolaylığına ve dilüsyon yönteminin avantajlarına sahip, ayrıca tekrarlanabilirliği yüksek olan bir yöntemdir. Bu nedenle duyarlılık çalışmalarında rahatlıkla ve güvenle kullanılabilir. Diğer bir avantajı ise, otomasyon sistemlerinde olduğu gibi fazla bir teknik alt yapıya ve özel yetiştirilmiş personele ihtiyaç göstermemesidir (35).

Antibiyotik kombinasyonlarının etkileşimleri Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) değerleri hesaplanarak saptanır. Her antibiyotiğin FİK değeri antibiyotiklerin kombinasyon halindeki MİK değerinin antibiyotiklerin tek başına MİK değerlerine bölünerek ayrı ayrı hesaplanır. Kombinasyonun etkinliğini belirleyen toplam FİK değeri (Σ FİK) iki antibiyotiğin FİK değerlerinin matematiksel toplamıdır. Σ FİK 0.5'den küçük ise sinerjistik, dörtten büyük ise antagonistik etkileşiminden, bu değerlerin arasında ise indiferans etkileşiminden bahsedilir. FİK değerlerinin hesaplanması ve yorumlanması Tablo-6 de gösterilmiştir.

Tablo-6 FİK değerlerinin hesaplanması

$$FİKA = MİK (Kombinasyon) / MİK A$$

$$FİKB = MİK (Kombinasyon) / MİK B$$

$$\Sigma FİK = FİK A + FİK B$$

$$\Sigma FİK \leq 0.5; \text{ Sinerjistik}$$

$$0.5 \geq \Sigma FİK < 1 \text{ Parsiyel Sinerjistik}$$

$$1 < \Sigma FİK \leq 4; \text{ İndiferens}$$

$$\Sigma FİK > 4 ; \text{ Antagonist}$$

Tek bir suş sonucu rapor ediliyorsa kombinasyonun etkileşimi ve bu etkileşimin hangi MİK değerlerinde saptandığı rapor edilir. Birden fazla sayıda suş çalışılıyorsa antibiyotik kombinasyonlarının etkileşimleri yüzde değer olarak rapor edilmelidir.

İn vitro çalışmalarda bir çok antibiyotiğin *Brucella* suşlarına etkili olduklarının belgelendirilmesine karşın bu bakterilerin makrofaj ve RES hücrelerine yerleşmeleri nedeniyle tedavide sorunlar yaşanmaktadır. Bu hücrelere yüksek konsantrasyonda ulaşamayan antibiyotiklerle yapılan tedaviler başarısız kalmaktadır. Uygun antibiyotik kullanılsa bile hücre içinde saklı kalan bakterilerle zamanla nöksler görülmektedir. Bruselloz tedavisinde başarılı olabilmek için; kullanılacak olan antibiyotik mutlaka makrofajlar içerisine girebilmeli, bakterisid etkili olmalı ve tedavi kombine ilaç tedavisi şeklinde olmalıdır (39).

Kombinasyon seçiminde dikkat edilmesi gereken önemli noktalar; hastanın klinik durumu, tedaviye uyumu, tedavinin maliyeti ve istenmeyen etkiler şeklinde özetlenebilir (39).

Brucella bakterilerine in-vitro etkili antibiyotikler tetrasiklinler, beta-laktamlar, aminoglikozidler, kloramfenikol, rifampisin, kanamisin, azitromisin, seftriakson, eritromisin, trimetoprim/sulfometoksazol, rifampisin, streptomisin ve kinolonlardır. *Brucella*'lar Polimiksin-B, basitrasin, sikloheksimid, nalidiksik asit, nistatin ve vankomisin gibi antibiyotikler ile antifungallare dirençlidirler (1,10-12,31).

Rifampisin anti bakteriyel etkisini, DNA'ya bağlı RNA polimeraz enzimi ile stabil kompleks oluşturarak ve DNA transkripsiyonunu önleyerek göstermektedir. Rifampisin vücuttaki bütün organ ve sıvılarda serum seviyesine eşit ve daha yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmektedir. Menenjit halinde BOS'da yüksek seviyelere yükselmektedir. Fagositler

içine girmekte ve intrasellüler üreyen bakterilerin üremesine engel olmaktadır (40). Hücre içine iyi penetrasyonu, kolay uygulanabilirliği, rifampisin'in bruselloz tedavisinde vazgeçilmez bir antibiyotik olmasını sağlamıştır. Tek başına kullanıldığında tedavi başarısızlığı ve nüks oranı çok yüksektir. Ülkemiz gibi tüberkülozun sıkça karşılaştığı ülkelerde uzun süreli rifampisin kullanımının direnç gelişimini arttırması ve rifampisine karşı antikor gelişimi de göz ardı edilmemelidir (31,36).

Doksisiklin uzun etki süreli tetrasiklin türevidir. Geniş spektrumlu, bakteriyostatik etkili bir antibiyotik olan tetrasiklinler, bakteri ribozomunun 30 S subünitine reversibl bağlanarak protein sentezini engellemektedir. Doku penetrasyonları fazla olmasına rağmen menenjitte bile BOS'da yüksek seviyelere ulaşamaz. Çocuklarda, gebelerde, süt veren annelerin tedavisinde kemiklere olan yan etkileri nedeniyle kullanılmaz. Emiliminin %95-100 olması ve besinlerden etkilenmemesi, dokulara geçişinin iyi, gastrointestinal sistem etkilerinin az olması, kolay tolere edilebilmesi ve günlük dozunun 4 yerine 2 kez olması nedeniyle hasta uyumunun iyi olması sebebiyle tetrasiklinler içerisinde doksisiklin seçilmiştir. (1,36,37).

Trimetoprim/sülfometaksazol, duyarlı bakteri hücresinde purinlerin, timidin'in metionin ve glisin'in sentezi için gerekli önemli bir kofaktör prekürsörü olan tetrahidrofolik sentez yollarını iki yerde bloke eder (38).

Streptomisin, bakteri ribozomlarının 30 S alt birimlerine irreversibl bağlanarak, ribozomlarda protein sentezini bloke ederler ve mRNA'nın taşıdığı genetik kodonun yanlış okunmasına ve sentezin tamamlanmadan sona ermesine neden olurlar (39).

Siprofloksasin, bakterilerin sitoplazması içine girerek, DNA'yı negatif supersarmal (supercoil) durumuna getiren ve topoizomerez II diye de adlandırılan DNA giraz enzimini ve topoizomerez IV'ü inhibe ederler ve böylece bakteri kromozomlarının birbirinden ayrılmasını, DNA replikasyonunu ve DNA translokasyonunu bozarlar (40).

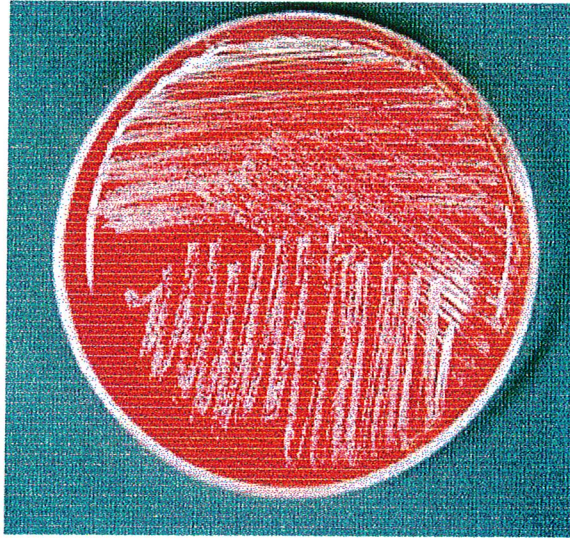
Azitromisin, eritromisinin lakton halkasına metillenmiş azot sokulmak suretiyle türetilen yarı-sentetik eritromisindir. Bakteri ribozomlarının 50 S alt-birimlerine reversibl olarak bağlanarak akseptör noktadaki (A noktasındaki) aminoasil tRNA molekülünün peptidil noktasındaki yeni sentez edilen polipeptid zincirinin uzamasını önlerler. Böylece bakteri hücresinin protein sentezini engellerler (40).

Günümüzde antimikrobiyal kombinasyonlar ağır ve septisemik hastalarda geniş spektrum sağlamak amacı ile kullanılmaktadır. Direnç gelişiminin önlenmesi ve doza bağlı toksisitenin azaltılması amacının yanısıra polimikrobiyal infeksiyonlarda antibiyotik kombinasyonlarının tedavide yeri vardır. Antibiyotikler kombinasyon halinde kullanıldığında

3.2. Bakteri Suşları

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, 1999-2001 yılları arasında izole edilen, *Brucella* spp. olarak ön tiplendirmesi yapılan ve $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gliserinli *Brucella* broth besiyerinde saklanan 44 suş çalışmaya alındı.

Tiplendirme çalışmaları ve antibiyotik duyarlılık deneyleri yapılacağı zaman suşların stok kültürlerinden %5 koyun kanlı Mueller-Hinton Agar besiyerlerine pasajları yapıldı. Bu besiyerleri, temin edilen taze koyun kanları ile laboratuvarımızda hazırlandı. Bir nolu resimde %5 koyun kanlı Mueller-Hinton Agar besiyerinde bakterinin görünüşü görülmektedir.



Resim-1. Koyun kanlı besiyerinde *brucella* kolonilerinin görünümü

Brucella spp. olarak ön tiplendirilmesi yapılan suşların tür tayini için, Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden temin edilen monovalan antiserumlarla lamda aglütinasyonuna, H₂S oluşumu, üreaz aktivitesi, CO₂ gereksinimi, tiyonin ve bazik fuksinin çeşitli konsantrasyonlarda üremelerine bakıldı (Tablo 1).

3.3. Duyarlılık Testleri ve Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkisinin Araştırılması

Tiplendirme sonucu 44 suşun tamamı *B. melitensis* olarak tanımlandı. Bu suşlar için kombine antibiyotik duyarlılık deneyleri yapıldı.

Antibiyotik kombinasyonu olarak rifampisin + doksisisiklin (RİF + DOX), rifampisin + trimetoprim / sulfometoksazol (RİF + TMP-SXT), doksisisiklin + trimetoprim /

sulfometoksazol (DOX + TMP-SXT) , streptomisin + doksisisiklin (SM + DOX), azitromisin + siprofloksasin (AZ + SİP) kombinasyonları seçildi.

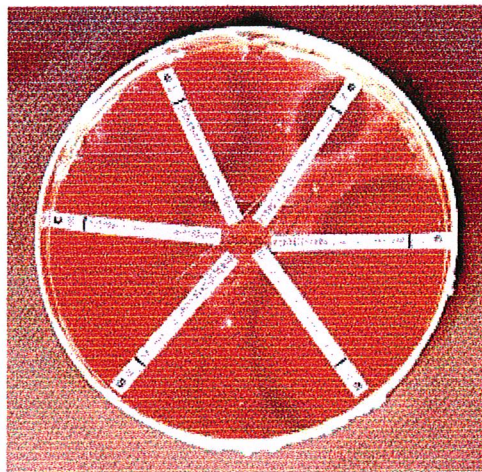
3.3.1.E-Test

E-test için 20 cm'lik petrilere steril edildi. Mueller-Hinton Agar besiyeri üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlandı ve steril edildi. Yaklaşık ısı 50 °C olunca daha önceden temin edilen defibrine taze koyun kanından %5 oranında eklendi. Besiyerinin kalınlığı 3mm olacak şekilde petrilere döküldü. Oluşan kabarcıklar alevle giderildi. Besiyerinin katılaşması beklendi. Bir gece kontrol için etüvde bekletildi.

Brucella broth besiyerileri üretici firma önerilerine göre hazırlandı ve steril tüplere yaklaşık 3cc olacak şekilde steril şartlarda kondu. *B. melitensis* olarak tiplendirilen ve %5 koyun kanlı Mueller-Hinton Agar besiyerindeki kolonilerden bu tüplere kondu. Mac Farland bulanıklıklarının 1 olması beklendi. Mac farland bulanıklıkları dansitometre (bio Mérieux) ile 1 olarak okundu.

Antibiyotik duyarlılığında kullanılacak E-testler firma önerilerine göre -20° C'de bekletilirken, 30 dakika önce oda ısısına çıkartıldı. Mac Farland bulanıklığı 1 olan tüplerdeki suşlar %5 koyun kanlı Mueller-Hinton Agar besiyerine steril şartlarda dökülerek eküvyonlu çubukla ekimleri yapıldı.

Önce bir petride her antibiyotik için tek başlarına stripler konup 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Oluşan MİK değerleri her antibiyotik için ayrı ayrı not edildi. İki numaralı resimde inkübasyon sonrası oluşan zonların görünümü.



Resim-2. Petride inkübasyondan sonra oluşan zonların görünümü

Daha sonra başka bir petride seçilen kombinasyona göre önce birinci ilaçlar kondu. 30 dakika sonra bunlar yerinden alınarak oluşan zonlara MİK'leri çakışacak şekilde ikinci ilaçlar kondu. Petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona kondu. Oluşan MİK değerleri okunarak tek tek not edildi.

3.3.2. İstatistik

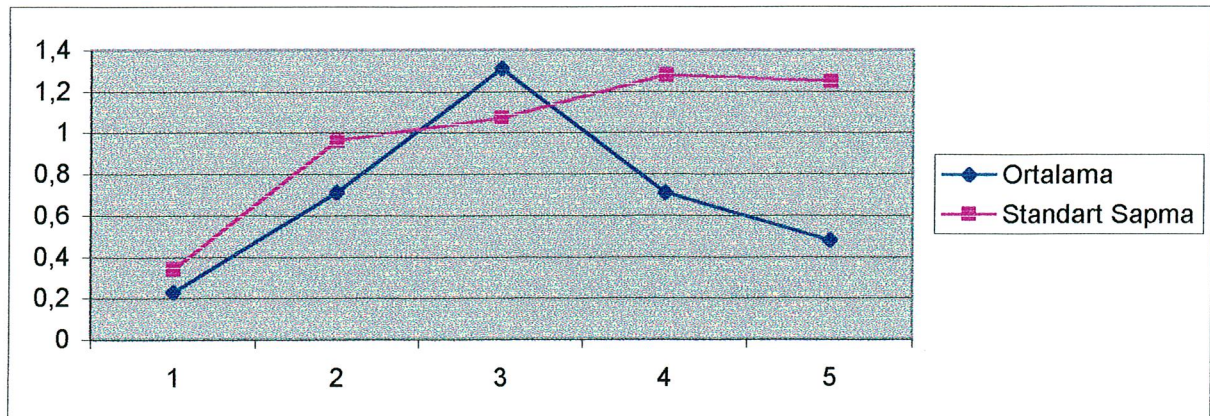
Bu çalışmaya istatistiksel olarak bağımlı gruplarda varyans analizi uygulandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. $F=11.896$, $p=0.0001$ Farkın kaynağını saptamaya yönelik Bonferroni testi uygulandı. RİF+DOX kombinasyonunda anlamlı düşük, TMP-SXT+DOX kombinasyonunda anlamlı yüksek fark bulundu. Sayısal değerler aşağıdaki tabloda görülmektedir.

Tablo 7. İstatistiksel değerlerin görünümü

	N	Ortalama	Standart sapma
RİF+DOX	44	0,23	0,34
RİF+TMP-SXT	44	0,71	0,96
TMP-SXT+DOX	44	1,31	1,07
SM+DOX	44	0,71	1,28
AZ+CİP	44	0,48	1,25

RİF+DOX kombinasyonu istatistiksel olarak en sinerjik kombinasyon tespit edilmiş olup bu kombinasyonu sarası ile AZ+SİP, RİF+TMP-SXT, SM+DOX ve TMP-SXT+DOX kombinasyonları izlemiştir. Kombinasyonların etkinliklerinin grafiksel olarak görünümü şu şekilde oluşmuştur.

Grafik 1. İstatistik değerlerinin grafikleri



1. RİF+DOX, 2. RİF+TMP-SXT, 3. TMP-SXT+DOX, 4. SM+DOX, 5. AZ+SİP

4. BULGULAR

Gaziantep Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda çeşitli servislerden gelen kann kültürlerinde üretilen 49 *brucella* suşunun 44'ü çalışmaya ayrıldı. Tablo 8'de üreme olan servislerden gelen kan kültür örneklerinin yıllara göre dağılımı görülmektedir.

Tablo 8. *Brucella* üreyen örneklerin yıllara ve servislere göre dağılımı görülmektedir.

SERVİS	1999	2000	2001	TOPLAM
Enfeksiyon H.	6	5	13	24
Pediyatri	2	7	3	12
İç Hastalıklar	0	4	2	6
Özel hastaneler	1	2	1	4
Noroloji	0	1	2	3
TOPLAM	9	19	21	49

Bu örneklerin servislere göre dağılımında ise enfeksiyon hastalıkları kliniği 24 örnek ile en fazla olup oranı % 48.97 dir. Bunu pediyatri 12 (% 24.48) örnek, dahiliye kliniği 6 (% 12.24) örnek ile izlemektedir. *Brucella* suşlarının izole edildiği klinik örneklerin dağılımı Tablo 9'de gösterilmiştir. Üreyen 49 *brucella* suşunun, 47 (% 95.91)'si kan, 2 (% 4.09)'si kemik iliği örneklerinden izole edilmiştir.

Tablo 9. *Brucella* suşlarının izole edildiği klinik örneklerin dağılımı

Klinik Örnek	Sayı	Yüzde
Kan Kültürü	47	95.91
Kemik İliği	2	4.09
Toplam	49	100.00

İzole edilen örneklerin aylara göre dağılımı dikkate alındığında üreme görülen örneklerin % 72.71'inin (32) Mayıs- ağustos ayları arasında geldiği görülmüştür. İzole edilen örneklerin aylara göre dağılımı tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 10. İzole edilen örneklerin aylara göre dağılımı.

Ay	Sayı	Yüzde (%)
Nisan	2	4.54
Mayıs	5	11.36
Haziran	10	22.72
Temmuz	9	20.45
Ağustos	8	18.18
Eylül	2	4.54
Ekim	3	6.84
Kasım	2	4.54
Aralık	3	6.84
TOPLAM	44	100.00

Aşağıdaki tablo ve grafiklerde kullanılan antibiyotiklerin elde edilen tek tek MİK değerleri ve çeşitli kombinasyonların *B. melitensis* suşuna karşı oluşturdukları MİK değerlerini göstermektedir.

Tek tek antibiyotiklerin oluşturduğu MİK değerlerinde rifampisin için MİK aralığı 0.094 - 3 µg/ml olarak bulunmuş olup suşların % 95.4 (42)'ünün MİK değerleri 0.75-3µg/ml aralığındadır. Doksisisiklin için MİK aralığı 0.094-3µg/ml, trimetoprim/sulfometaksazol için MİK aralığı 0.016-0.125µg/ml arasında , streptomisin için 0.016-3 µg/ml arasında, azitromisin için 0.25-8µg7ml arasında, siprofloksasin için 0.016-1µg/ml arasında bulunmuştur. Tablo 11'da antibiyotiklerin tek tek oluşturdukları MİK değerleri ve suş sayıları görülmektedir.

RİF+DOX kombinasyonu çalışmaya alınan 44 *B. melitensis* suşunun % 56.7 (25)'sini 0.016 µg/ml'de etkilemektedir. Tablo 12'de RİF+DOX kombinasyonu için suşların etkilendiği MİK değerleri görülmektedir.

Tablo 12. RİF+DOX kombinasyonunun MİK değerleri

MİK (µg/ml)	Duyarlı suş sayısı	Yüzde(%)
0.016	25	56.7
0.019	1	2.3
0.023	1	2.3
0.047	2	4.6
0.064	9	20.5
0.094	6	13.6
TOPLAM	44	100.0

RİF+SXT kombinasyonu 0.002-0.125µg/ml aralığında tüm suşlar etkili bulunmuştur. Bu kombinasyonda 3 (% 6.8) suş 0.125µg/ml de etkilenmektedir. Tablo 13'de RİF+SXT kombinasyonunun suşları etkiledikleri MİK değerleri görülmektedir.

Tablo 13. RİF+TMP-SXT kombinasyonunun MİK değerleri

MİK (µg/ml)	Duyarlı suş sayısı	Yüzde(%)
0.002	23	52.3
0.023	1	2.3
0.032	3	6.8
0.047	1	2.3
0.064	8	18.1
0.094	5	11.4
0.125	3	6.8
TOPLAM	44	100.0

TMP-SXT+DOX kombinasyonu 0.002-0.125 µg/ml aralığında çalışmaya alınan tüm suşlar etkili bulunmuştur. Suşların 22 (% 50)'si 0.050-0.125 µg/ml aralığındaki antibiyotik kombinasyonunda etkilenmektedir. Tablo 14'de bu kombinasyon için oluşan MİK değerleri görülmektedir.

Tablo 14. TMP-SXT+DOX kombinasyonun MİK değerleri

MİK (µg/ml)	Duyarlı suş sayısı	Yüzde (%)
0.002	1	2.3
0.016	13	29.5
0.019	2	4.6
0.025	4	9.1
0.032	2	4.6
0.050	2	4.6
0.064	5	11.3
0.094	5	11.3
0.125	10	22.7
TOPLAM	44	100.00

SM+DOX kombinasyonu 24 (%54.6) suşu 0.094-0.125 µg/ml aralığında etkilemektedir. Suşların tamamı 0.019-0.125µg/ml aralığında duyarlı olarak bulunmuştur. Tablo 15'de kombinasyonun MİK değerleri ve suş sayıları görülmektedir.

Tablo 15. SM+DOX kombinasyonun MİK değerleri

MİK (µg/ml)	Duyarlı suş sayısı	Yüzde(%)
0.019	10	22.7
0.025	7	15.9
0.064	3	6.8
0.094	10	22.7
0.125	14	31.9
TOPLAM	44	100.00

25	1	0.25	0.016	0.016	0.06	0.076	S
26	2	0.75	0.016	0.008	0.02	0.028	S
27	1.5	0.75	0.064	0.04	0.08	0.12	S
28	1	0.25	0.016	0.016	0.06	0.076	S
29	1	0.125	0.016	0.016	0.128	0.144	S
30	1	0.75	0.019	0.019	0.025	0.269	S
31	1	0.75	0.016	0.016	0.02	0.026	S
32	1	0.19	0.094	0.094	0.49	0.58	S
33	1.5	0.75	0.064	0.04	0.08	0.12	S
34	2	0.38	0.094	0.04	0.24	0.28	S
35	2	0.50	0.016	0.008	0.03	0.038	S
36	2	0.50	0.064	0.032	0.128	0.16	S
37	2	0.50	0.016	0.008	0.03	0.038	S
38	1.5	0.38	0.016	0.01	0.04	0.05	S
39	2	0.50	0.016	0.008	0.03	0.038	S
40	2	0.25	0.047	0.02	0.18	0.20	S
41	0.094	0.125	0.016	0.17	0.12	0.29	S
42	2	0.094	0.016	0.008	0.17	0.178	S
43	1	0.094	0.094	0.094	1	1.094	ID
44	1	0.38	0.016	0.016	0.04	0.056	S

Sinerji: S, Indiferens: ID

RİF+TMP-SXT kombinasyonu 24 (% 54) suşda sinerjik etki göstermiş, 17 (% 39) suşda indifferens etki, 3 (% 7) suşda ise parsiyel sinerjik etkili bulunmuştur. Tablo 18'de bu kombinasyonun Σ FİK değerleri ve yorumları görülmektedir.

Tablo-18. RİF+TMP-SXT Kombinasyonun FİK Değerleri
(Σ FİK=FİK RİF+FİK TMP-SXT)

SUŞ NO	RİF	TMP-SXT	RİF+ TMP-SXT	FİK RİF	FİK TMP-SXT	Σ FİK	YORUM
1	1.5	0.125	0.032	0.02	0.25	0.27	S
2	3	0.064	0.064	0.02	1	1.02	İD
3	1.5	0.125	0.094	0.06	0.75	0.812	PS
4	2	0.032	0.094	0.04	2.93	2.97	İD
5	0.094	0.125	0.064	0.68	0.51	1.19	İD
6	0.75	0.064	0.002	0.002	0.031	0.033	S
7	1.5	0.064	0.032	0.02	0.5	0.52	PS
8	2	0.125	0.002	0.001	0.016	0.017	S
9	2	0.032	0.125	0.06	3.9	3.96	İD
10	1.5	0.064	0.002	0.001	0.03	0.031	S
11	1.5	0.047	0.125	0.08	2.6	2.68	İD
12	0.75	0.064	0.094	0.12	1.46	1.58	İD
13	2	0.047	0.002	0.001	0.04	0.041	S
14	1.5	0.125	0.032	0.02	0.25	0.27	S
15	2	0.064	0.002	0.001	0.032	0.033	S
16	2	0.047	0.002	0.001	0.04	0.041	S
17	2	0.064	0.064	0.032	1	1.032	İD
18	0.75	0.064	0.002	0.002	0.031	0.033	S
19	2	0.125	0.002	0.001	0.016	0.017	S
20	1	0.064	0.002	0.001	0.032	0.033	S
21	1	0.016	0.002	0.001	0.008	0.009	S
22	0.75	0.064	0.064	0.08	1	1.08	İD
23	1	0.047	0.023	0.023	0.48	0.503	PS

24	2	0.047	0.002	0.001	0.04	0.041	S
25	1	0.064	0.125	0.125	1.9	2.025	İD
26	2	0.064	0.002	0.001	0.03	0.031	S
27	1.5	0.047	0.002	0.001	0.04	0.041	S
28	1	0.047	0.002	0.002	0.04	0.042	S
29	1	0.064	0.002	0.002	0.03	0.032	S
30	1	0.094	0.094	0.094	1	1.094	İD
31	1	0.064	0.002	0.002	0.03	0.032	S
32	1	0.032	0.047	0.047	1.4	1.447	İD
33	1.5	0.064	0.064	0.04	1	1.04	İD
34	2	0.047	0.094	0.047	2	2.047	İD
35	2	0.047	0.002	0.001	0.042	0.043	S
36	2	0.064	0.064	0.032	1	1.032	İD
37	2	0.047	0.002	0.001	0.04	0.041	S
38	1.5	0.032	0.064	0.04	2	2.04	İD
39	2	0.125	0.002	0.001	0.016	0.017	S
40	2	0.032	0.064	0.032	2	2.032	İD
41	0.094	0.064	0.002	0.02	0.03	0.05	S
42	2	0.047	0.002	0.001	0.04	0.041	S
43	1	0.032	0.002	0.002	0.06	0.062	S
44	1	0.094	0.002	0.002	0.02	0.022	S

Parsiyel Sinerji: PS

DOX+TMP-SXT kombinasyonunda 23 (% 52) suşda indiferens etki görülmüş olup en fazla indiferens etki bu kombinasyonda saptanmıştır. Onyeddi (% 38) suşda sinerjizm görüldürken, 4 (% 9) suşda parsiyel sinerjizm bulunmuştur. Bu kombinasyonun Σ FİK değerleri ve yorumları Tablo 19’da görülmektedir.

Tablo-19. DOX+TMP-SXT Kombinasyonun FİK Değerleri
(Σ FİK=FİK DOX+FİK TMP-SXT)

SUŞ NO	DOX	TMP-SXT	DOX+ TMP-SXT	FİK DOX	FİK TMP-SXT	Σ FİK	YORUM
1	0.38	0.125	0.025	0.06	0.2	0.26	S
2	0.25	0.064	0.016	0.064	0.25	0.314	S
3	0.38	0.125	0.016	0.04	0.12	0.16	S
4	0.25	0.032	0.016	0.064	0.5	0.564	PS
5	0.25	0.125	0.032	0.12	0.25	0.37	S
6	0.38	0.064	0.016	0.04	0.25	0.29	S
7	0.25	0.064	0.125	0.5	1.95	2.45	İD
8	0.50	0.125	0.016	0.032	0.12	0.152	S
9	0.25	0.032	0.094	0.37	2.93	3.3	İD
10	0.38	0.064	0.016	0.04	0.25	0.29	S
11	0.25	0.047	0.064	0.25	1.36	1.61	İD
12	0.125	0.064	0.016	0.12	0.25	0.37	S
13	0.25	0.047	0.019	0.07	0.40	0.47	S
14	0.50	0.125	0.016	0.032	0.12	0.152	S
15	0.50	0.064	0.025	0.05	0.39	0.44	S
16	0.25	0.047	0.016	0.064	0.34	0.404	S
17	0.25	0.064	0.064	0.25	1	1.25	İD
18	0.25	0.064	0.125	0.5	1.9	2.4	İD
19	0.25	0.125	0.064	0.25	.512	0.762	PS
20	0.19	0.064	0.019	0.1	0.29	0.39	S
21	0.094	0.016	0.016	0.17	1	1.17	İD

22	0.38	0.064	0.125	0.32	1.9	2.22	İD
23	0.25	0.047	0.016	0.06	0.34	0.4	S
24	1	0.047	0.125	0.125	2.6	2.725	İD
25	0.25	0.064	0.125	0.5	1.9	2.4	İD
26	0.75	0.064	0.125	0.16	1.9	2.06	İD
27	0.75	0.047	0.094	0.12	2	2.12	İD
28	0.25	0.047	0.125	0.5	2.6	3.1	İD
29	0.125	0.064	0.050	0.4	0.78	1.18	İD
30	0.75	0.094	0.025	0.03	0.26	0.29	S
31	0.75	0.064	0.125	0.03	1.95	1.98	İD
32	0.19	0.032	0.016	0.08	0.5	0.58	PS
33	0.75	0.064	0.094	0.12	1.46	1.58	İD
34	0.38	0.047	0.125	0.32	2.6	2.92	İD
35	0.50	0.047	0.032	0.064	0.68	0.744	PS
36	0.50	0.064	0.064	0.12	1	1.12	İD
37	0.50	0.047	0.094	0.18	2	2.18	İD
38	0.38	0.032	0.064	0.16	2	2.16	İD
39	0.50	0.125	0.002	0.004	0.016	0.02	S
40	0.25	0.032	0.094	0.25	2.9	3.15	İD
41	0.125	0.064	0.050	0.4	0.78	1.18	İD
42	0.094	0.047	0.125	1.32	2.6	3.92	İD
43	0.094	0.032	0.025	1.32	0.78	2.1	İD
44	0.38	0.094	0.016	0.04	0.17	0.21	S

SM+DOX kombinasyonunda 27 (% 61) suşda sinerjizm, sekizer (% 18) suşda parsiyel sinerjizm ve indiferens etkileşim, bir (% 2) suşda ise antagonizma saptanmıştır. Tablo 20’de SM+DOX kombinasyonuna ait Σ FİK değerleri ve yorumları görülmektedir.

Tablo 20. SM+DOX Kombinasyonun FİK Değerleri
(Σ FİK=FİK SM+FİK DOX)

SUŞ NO	SM	DOX	SM+DOX	FİK SM	FİK DOX	Σ FİK	YORUM
1	3	0.38	0.064	0.02	0.16	0.18	S
2	1	0.25	0.025	0.025	0.1	0.125	S
3	0.38	0.38	0.094	0.24	0.24	0.48	S
4	0.50	0.25	0.094	0.18	0.37	0.55	PS
5	1	0.25	0.125	0.125	0.5	0.625	PS
6	0.016	0.38	0.125	7.8	0.32	8.12	A
7	0.064	0.25	0.094	1.46	0.376	1.83	İD
8	0.75	0.50	0.019	0.02	0.03	0.05	S
9	0.25	0.25	0.125	0.5	0.5	0.1	S
10	0.50	0.38	0.094	0.18	0.24	0.42	S
11	0.50	0.25	0.094	0.18	0.37	0.55	PS
12	1	0.125	0.125	0.125	1	1.125	İD
13	0.125	0.25	0.025	0.2	0.1	0.3	S
14	0.38	0.50	0.094	0.24	0.18	0.42	S
15	1	0.50	0.019	0.019	0.03	0.057	S
16	0.125	0.25	0.019	0.15	0.07	0.22	S
17	1	0.25	0.125	0.125	0.5	0.625	PS
18	1.5	0.25	0.025	0.01	0.1	0.11	S
19	0.064	0.25	0.019	0.29	0.07	0.36	S
20	2	0.19	0.019	0.009	0.1	0.109	İD
21	0.25	0.094	0.019	0.76	0.20	0.96	PS
22	0.064	0.38	0.125	1.9	0.32	2.22	İD

23	1.5	0.25	0.094	0.06	0.37	0.43	S
24	0.75	1	0.064	0.08	0.06	0.14	S
25	0.064	0.25	0.064	1	0.25	1.25	İD
26	0.050	0.75	0.125	0.25	0.16	0.41	S
27	2	0.75	0.094	0.047	0.12	0.167	S
28	0.064	0.25	0.125	1.95	0.5	2.45	İD
29	0.19	0.125	0.019	0.1	0.15	0.25	S
30	1	0.75	0.019	0.019	0.02	0.039	S
31	0.50	0.75	0.019	0.03	0.02	0.05	S
32	1	0.19	0.094	0.094	0.49	0.584	PS
33	1.5	0.75	0.125	0.08	0.16	0.24	S
34	1	0.38	0.125	0.125	0.32	0.445	S
35	1.5	0.50	0.019	0.01	0.03	0.04	S
36	0.50	0.50	0.094	0.18	0.18	0.36	S
37	0.50	0.50	0.025	0.05	0.05	0.1	S
38	0.125	0.38	0.125	1	0.32	1.32	İD
39	0.75	0.50	0.025	0.03	0.05	0.08	S
40	0.75	0.25	0.125	0.16	0.5	0.66	PS
41	1	0.125	0.025	0.025	0.2	0.225	S
42	0.75	0.094	0.025	0.03	0.26	0.29	S
43	0.50	0.094	0.125	0.25	1.3	1.55	İD
44	0.125	0.38	0.125	1	0.32	1.32	İD

Antagonizma: A

AZ+SİP kombinasyonunda 37 (% 84) suşda sinerjizm görülmüştür. RİF+DOX kombinasyonundan sonra en fazla sinerjizm bu kombinasyonda görülmektedir. Beş (% 11) suşda parsiyel sinerjizm, iki (% 4) suşda antagonizma bulunmuştur. En fazla antagonizma bu kombinasyonda görülmüştür. Bu kombinasyona ait Σ FİK değerleri ve yorumları Tablo 21'de görülmektedir.

Tablo-21. AZ+SİP Kombinasyonun FİK Değerleri
(Σ FİK=FİK AZ+FİK SIP)

SUŞ NO	AZ	SİP	AZ+SİP	FİK AZ	FİK SİP	Σ FİK	YORUM
1	6	0.125	0.016	0.002	0.12	0.122	S
2	6	0.064	0.047	0.007	0.73	0.737	PS
3	1.5	0.125	0.016	0.01	0.12	0.13	S
4	8	0.125	0.047	0.005	0.376	0.381	S
5	0.25	0.064	0.023	0.092	0.359	0.451	S
6	2	1	0.047	0.023	0.047	0.07	S
7	2	0.125	0.064	0.032	0.512	0.544	PS
8	1	0.125	0.016	0.016	0.128	0.144	S
9	2	0.19	0.016	0.008	0.08	0.088	S
10	2	0.19	0.016	0.008	0.08	0.088	S
11	1.5	0.125	0.016	0.01	0.128	0.138	S
12	2	0.19	0.023	0.01	0.12	0.22	S
13	1	0.125	0.016	0.016	0.128	0.144	S
14	1.5	0.19	0.016	0.01	0.08	0.09	S
15	2	0.38	0.016	0.008	0.042	0.050	S
16	1	0.125	0.016	0.016	0.128	0.144	S
17	1.5	0.125	0.002	0.004	0.016	0.02	S
18	1.5	0.125	0.016	0.01	0.12	0.13	S
19	1.5	0.19	0.064	0.04	0.33	0.37	S
20	4	0.32	0.047	0.01	0.14	0.15	S

21	2	0.19	0.064	0.032	0.33	0.362	S
22	1	0.25	0.125	0.125	0.5	0.625	PS
23	6	0.125	0.032	0.005	0.256	0.261	S
24	6	0.016	0.094	0.01	5.875	5.88	A
25	4	0.32	0.023	0.05	0.1	0.15	S
26	3	0.25	0.032	0.01	0.12	0.13	S
27	2	0.19	0.047	0.02	0.24	0.26	S
28	8	0.25	0.094	0.01	0.376	0.386	S
29	2	0.25	0.016	0.008	0.064	0.072	S
30	2	0.125	0.064	0.032	0.512	0.544	PS
31	6	0.38	0.094	0.01	0.247	0.257	S
32	2	0.19	0.016	0.008	0.08	0.088	S
33	1.5	0.125	0.064	0.04	0.512	0.552	PS
34	2	0.125	0.75	0.375	6	6.375	A
35	1	0.19	0.047	0.047	0.24	0.287	S
36	2	0.19	0.016	0.008	0.08	0.088	S
37	1	0.125	0.016	0.016	0.128	0.144	S
38	1.5	0.19	0.023	0.01	0.12	0.13	S
39	2	0.38	0.016	0.008	0.04	0.048	S
40	1.5	0.19	0.047	0.03	0.24	0.27	S
41	1.5	0.38	0.023	0.01	0.06	0.07	S
42	3	0.50	0.016	0.005	0.032	0.037	S
43	3	0.50	0.125	0.004	0.25	0.254	S
44	1	0.38	0.016	0.016	0.04	0.056	S

Kombinasyonların test edilen *B.melitensis* suşlarına sinerjizm, parsiyel sinerjizm, indiferens ve antagonizma oranları Tablo 21’de gösterilmiştir.

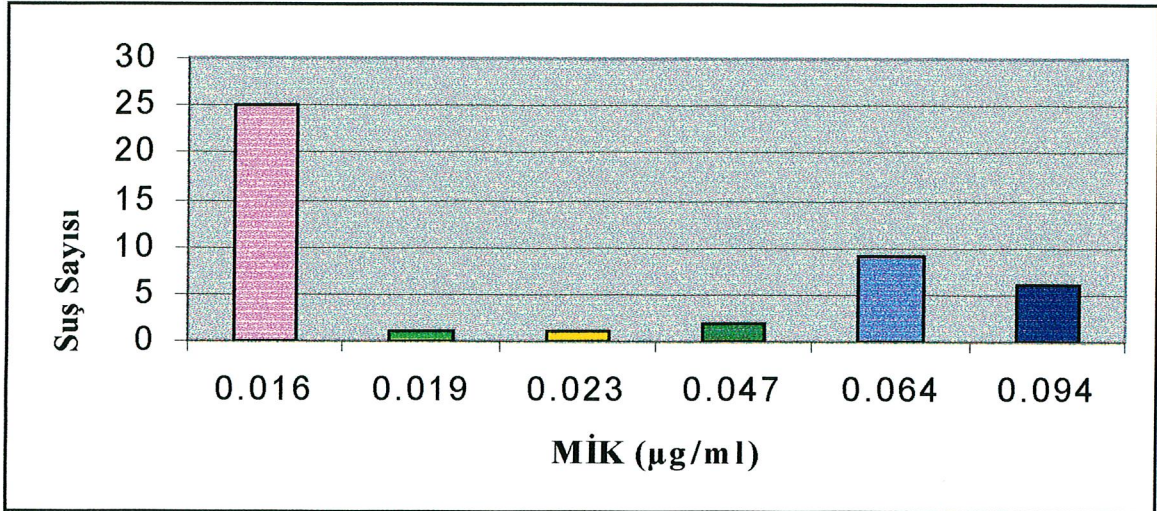
Tablo 22. Kombinasyonların FIK index yüzdelerinin yorumları

Kombinasyon	S. (≤ 0.5) (%)	P. S. ($0.5 \geq, <1$) (%)	İ. ($>1, <4$) (%)	A. (≤ 4) (%)
RİF+DOX	93 (41/44)	--	7 (3 / 44)	--
RİF+ TMP-SXT	54 (24/44)	7 (3 / 44)	39 (17/ 44)	--
TMP-SXT +DOX	38 (17/44)	9 (4 / 44)	52 (23/ 44)	--
SM+DOX	61 (27/44)	18 (8 / 44)	18 (8 / 44)	2 (1 / 44)
AZ+CİP	84 (37/44)	11 (5 / 44)	----	4 (2 / 44)

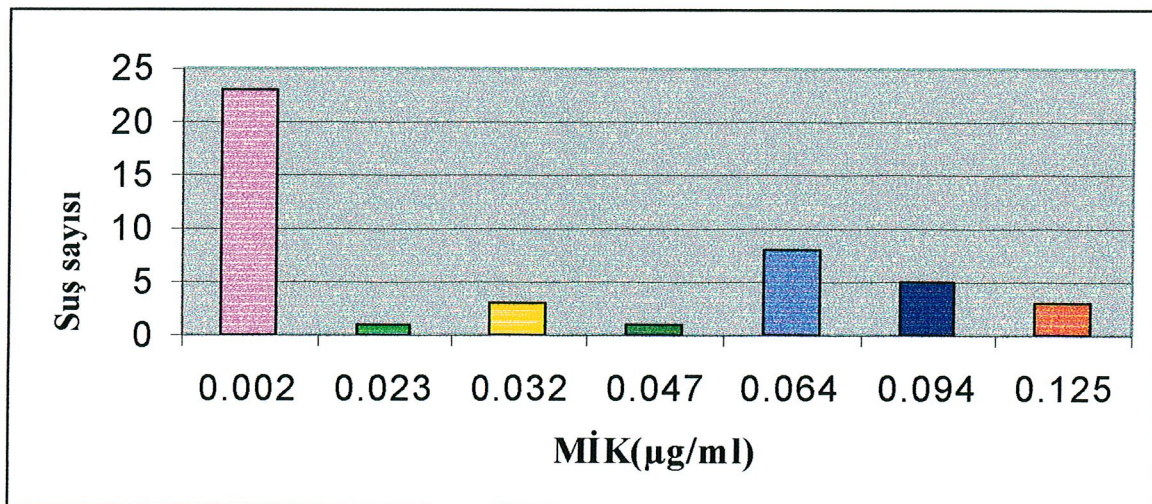
S: Sinerjizm, P.S: Parsiyel Sinerjizm, I: İndiferens, A: Antagonizma

Kombinasyonların ve tüm çalışmanın MİK değerlerinin grafiksel olarak görünümü aşağıdaki 2,3,4,5,6,7 numaralı grafiklerde görülmektedir.

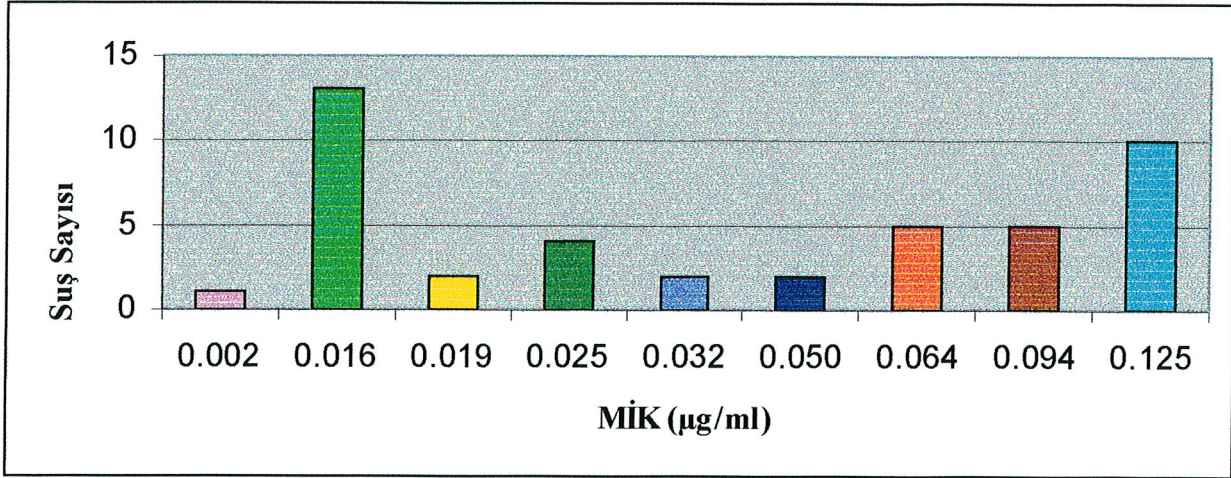
Grafik 2. RİF + DOX kombinasyonunun grafiksel olarak görünümü.



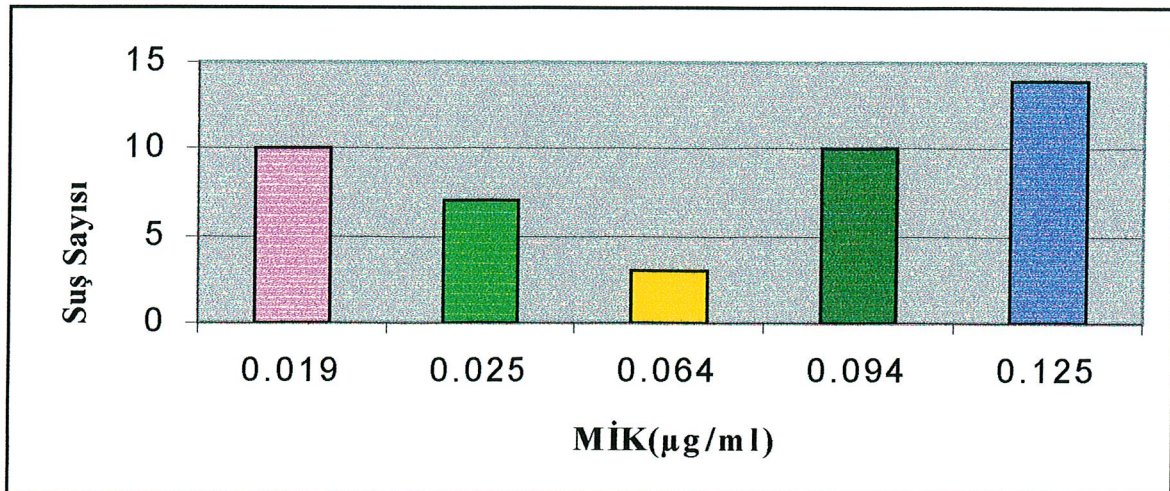
Grafik 3. RİF + TMP-SXT Kombinasyonunun grafiksel olarak görünümü.



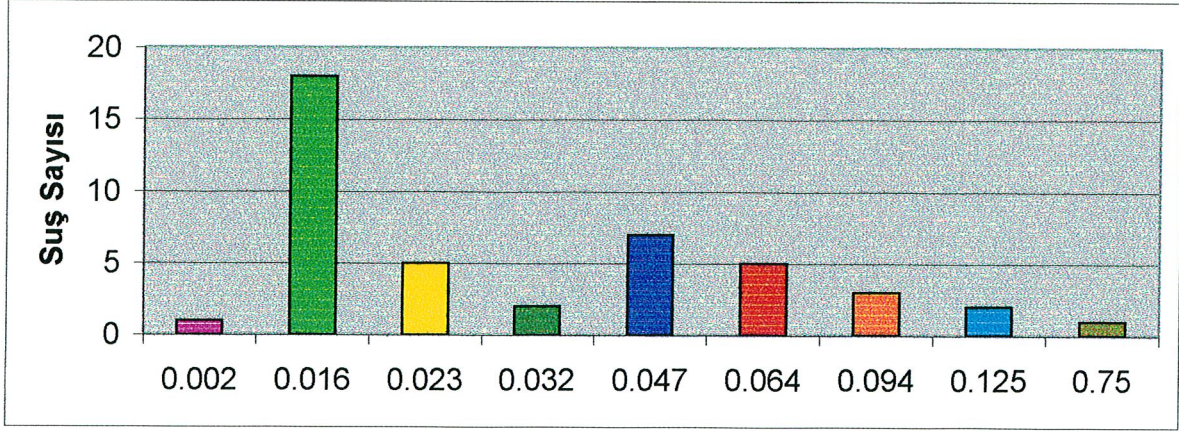
Grafik 4. TMP-SXT+ DOX kombinasyonunun grafiksel olarak görünümü.



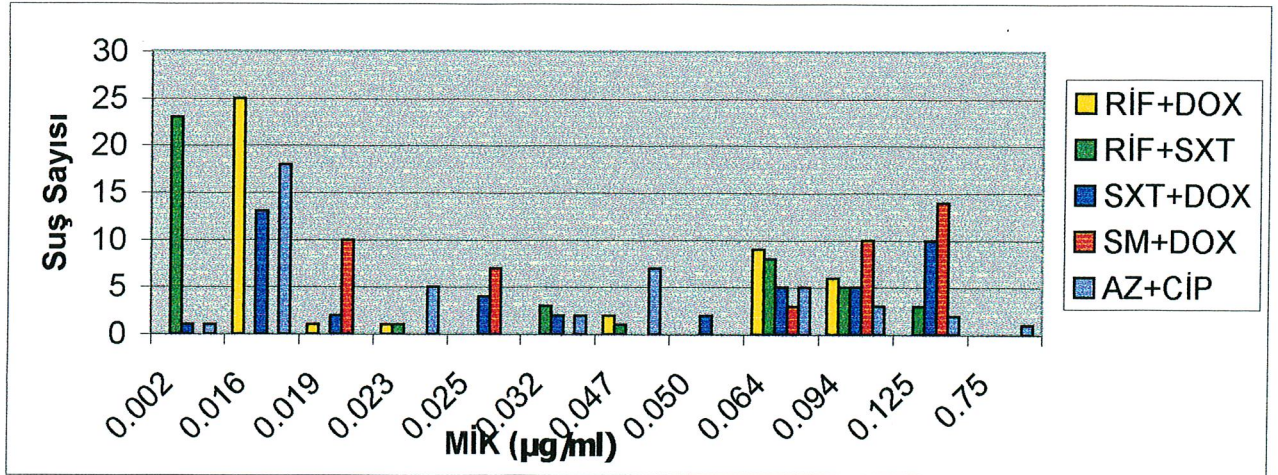
Grafik 5. SM + DOX kombinasyonunun grafiksel olarak görünümü.



Grafik-6.AZ+CİP Kombinasyonunun grafiksel olarak görünümü



Grafik 7. Beş kombinasyona ait sonuçların grafiksel olarak görünümü.



5. TARTIŞMA

Bruselloz insanlara hayvanların sütleri, infekte süttten yapılmış süt ürünleri, gebelik materyalleri gibi infekte tüm hayvan materyallerinden bulaşır (41,42). Günümüzde bruselloz olguları, hayvanlardan *Brucella*'yı eradike etmiş ülkelerde görülmemekle birlikte, ülkemizin de içerisinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri, Arap yarım adası başta olmak üzere Orta ve Batı Avrupa ülkeleri, Latin Amerika ülkeleri, Batı ve Orta Asya ülkelerinde görülmektedir (5). İnfeksiyonun rezervuarı olan koyun, keçi, sığır, domuz gibi çiftlik hayvanlarının yanı sıra köpekler ve vahşi hayvanlar da insanlar için önemli kaynakları oluştururlar. Ancak belirtilen bu hayvan türleri arasında, hastalığı bulaştırma şekilleri arasında belirgin farklar bulunmaktadır; örneğin koyun ve keçilerde görülen *B. melitensis*, insan için oldukça patojen bir türdür. Sığırlarda bulunan *B. abortus*'un patojenitesi daha azdır. (1,4,43).

Ülkemizdeki olguların çoğu *B. melitensis*'e bağlıdır (8). Çalışmaya aldığımız 44 suşun tamamı *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda *B. abortus*'un bulunmamasının nedenleri olarak; *B. melitensis*'in daha fazla patojen olması, *B. melitensis*'in mide pH'sından *B. abortus* kadar etkilenmemesi, laboratuvarımıza gelen kültür numunelerinin hem aerob hemde anaerob şişelere bazen alınmaması şeklinde açıklanabilir (1,43). *B. abortus* özellikle ilk izolasyonunda %5-10 CO₂ 'e gerek duymaktadır.

Hastalık etkeni olan *Brucella* bakterisinin intraselüler yerleşmesi, başta retiküloendotelial sistem olmak üzere karaciğer, dalak, kemik iliği, böbrek, santral sinir sistemi, endokard, testis, overlerde hastalığa neden olmaktadır. Brusella bakterileri hücre içi patojendirler ve fagolizozom gibi asidik ortamlara (~pH 5.4) direnç gösterirler. İntraselüler yerleşimleri bakterilerin antikorlardan ve antimikrobiklerden korunmalarını sağlar. Bu nedenle antimikrobikler ile yapılan tedavide mutlaka hücre içerisine iyi penetre olabilen kombinasyonlar seçilmeli ve tedavi süresi uzun tutulmalıdır. Bu yapılmadığı takdirde tedavide yaşanan güçlükler artmakta, bunun sonucu olarak da nüksler ve komplikasyonlar görülmektedir. Relapsın yada tedavideki başarısızlığın sorumlusu olarak bakterilerin hücre içerisine iyi penetre olmaları düşünülmektedir. Bakteriler fagosite edildikleri makrofajlar

içerisine iyi penetre olmamaları düşünülmektedir. Bakteriler fagosite edildikleri makrofajlar içerisinde canlılıklarını sürdürmekte, verilen antimikrobikler bu bölgeye ulaşmamakta veya ulaşabilseler de bakterileri bazı nedenlerle inhibe edememektedirler. Böylece antimikrobikler uzun süreli verilmediklerinde fagosite edildikleri hücrelerde gizlenen bakteriler bir şekilde açığa çıkmakta, relapslara ya da tedavide başarısızlığa neden olmaktadır. Dolaylı olarak bu da ekonomik kayıplara neden olmakta, kronik vakalarda yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (9,11,13,31,32).

Ülkemizde ve dünyada birçok bölgede karşılaşılan bruselloz, zaman zaman küçük epidemiler yapar. Özellikle mayıs-ağustos aylarında hastalık fazla oranda görülmektedir. Çalışmamızda *Brucella* bakterisi ürettiğimiz olgular en fazla bu dönemde olmuştur (Tablo 10). Bu dönemde bölgemizde hayvanların yavrulama döneminin başladığı, süt üretiminin en üst noktaya çıktığı, tatil dolayısıyla kırsal alana göçün olduğu ve peynir üretiminin arttığı dönem olması nedeniyle hasta sayısında artış olmuştur. Halk sağlığını olumsuz yönde etkileyip, ciddi düzeyde ekonomik kayıplara neden olan bruselloz, aynı zamanda etkilenen kesimlerde yaşam kalitesini de düşürmektedir (5). Yaklaşık 1850 'lerden beri bilinen bir hastalık olmasına karşın, tedavide kullanılması gereken ilaçların en etkili ve en az toksik olanının seçimi halen tartışmalıdır (1,36).

Zor üreyen mikroorganizmaların bir kısmı için antimikrobiyal duyarlılık deneylerinde bir standart getirilmesine karşın, bruselloz için üzerinde birlik sağlanmış bir standart henüz yoktur (32).

Brucelloz tedavisinde tek bir antibiyotik kullanılması önerilmemektedir. Tekli bir protokolün relapslara neden olduğu görüşü kabul edilmektedir (9). Kabul gören tedavi protokolleri aşağıdaki biçimde özetlenebilir.

1. RİF+DOX kombinasyonu: Günümüzde en sık önerilen kombinasyondur (9).
2. SM+DOX kombinasyonu: SM'li kombinasyonlarda relaps oranının daha düşük olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (9).
3. Tetrasiklin+ SM kombinasyonu: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) nün önerdiği ilk rejimdir.
4. RİF+SXT kombinasyonu: Bu kombinasyonun etkili olduğuna dair az sayıda çalışma mevcuttur.
5. AZ+SIP kombinasyonu: Son zamanlarda klinik kullanımı olan bir kombinasyondur.

Hastalığın klasik tedavisi RİF-DOX ve SM-DOX şeklindedir. SM'in intramüsküler enjeksiyonları gerektirmesi ve 8. Sinir üzerine irreversibl toksik etkileri nedeniyle ve de SM ve

tetrasiklinin gebelerde kontrendike olması, tetrasiklinlerin 8 yaş altında kemiklerde istenmeyen etkiler oluşturması (4,36,37,44), bu yaş grubunda kullanılacak bir kombinasyon olan RİF+SXT kombinasyonunu çalışmamıza eklememize neden olmuştur. Günde iki defa alınıyor olması, emiliminin % 95-100 olması, gastrointestinal sistemde irritasyona yol açmaması nedeniyle tetrasiklinlerden de doksisisiklini seçmemizi sağlamıştır.

Son yıllarda azitromisin ve siprofloksasin ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur. Tüberküloz sık görüldüğü ülkemizde rifampisin ve streptomisin sıklıkla bu infeksiyon için kullanılması, rifampisinin hepatotoksik etkisinin fazla olması, streptomisin doza bağlı irreversibl 8. sinir üzerine toksik etkisinin olması nedeniyle azitromisin+siprofloksasin kombinasyonunu seçmemize neden olmuştur

Antibiyotik kombinasyonlarının in-vitro etkileşimlerini doğru olarak gösteren bir yöntemin geliştirilmesi yıllardır araştırmacıların hedefi olmuştur. Yaygın olarak kullanılan dama tahtası ve zamana bağlı ölüm yöntemlerinin uygulanmasında ve yorumlanmasında bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Kaldı ki *Brucella* bakterisi için kabul edilen standart bir yöntem henüz yoktur. E-test yönteminin antibiyotik kombinasyonlarının etkileşimini araştırmak amacı ile kullanılması diğer iki klasik yöntemle göre daha yenidir. İn vitro sinerji testlerinin oldukça zahmetli ve zaman alıcı olduğu düşünülürse E-test'in rutin laboratuvarında kullanımı teknik açıdan daha avantajlıdır.

Rifampisin hücre içi iyi penetrasyonu, kullanım kolaylığı bu antibiyotiği bruselloz tedavisinde ön plana çıkarmıştır (45). Tek başına kullanılmadan kombinasyon tedavisi şeklinde başarıyla kullanılabilir (46).

Bosch ve ark.'nın (47), 95 *B. melitensis* suşlarına karşı yaptıkları duyarlılık çalışmasında, rifampisinin MİK aralığını 0.12-4.0 µg/ml, olarak bulunmuş ve suşların % 98'i 2.0 µg/ml'de inhibe olmuştur. Khan ve ark.'nın (44), yaptığı çalışmada ise rifampisin için MİK aralığı 0.02-2.5 µg/ml, MİK₉₀ değeri 1.25µg/ml olarak bulunmuştur. Rubinstein ve ark.'nın (48), 86 *B. melitensis* suşu ile yaptıkları rifampisin duyarlılık çalışmasında MİK₉₀ değerini 4 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Akova ve ark.'nın (46), 1993 yılında 49 *B. melitensis* suşuna karşı yaptıkları duyarlılık çalışmasında, rifampisin MİK aralığını 0.03-1.0 µg/ml ve MİK₉₀ değerini 0.5µg/ml, 1995 yılında ise benzer çalışmayı 42 *B. melitensis* suşuna yapmışlar ve MİK₉₀ değerini 8.0 µg/ml olarak bulmuşlardır. Ariza ve arkadaşları (49), 81 *B. melitensis* suşuna rifampisin duyarlılığı çalışmışlar, MİK aralığını 0.5-2.0 µg/ml, MİK₉₀ değerini 1µg/ml bulmuşlardır. Evrensel (50), 1996 yılında yapmış olduğu uzmanlık tezi çalışmasında 42 *B. melitensis* suşuna rifampisin duyarlılığı çalışmış, MİK aralığını 0.5-4.0 µg/ml, MİK₉₀ değerini ise 2.0µg/ml olarak bulmuştur. Sümerkan ve ark.'nın (51), 52 *B.*

melitensis suşuna yaptıkları duyarlılık çalışmasında rifampisin MİK değerlerini 1-4 µg/ml arasında bulmuşlar, MİK₉₀ değerini 4µg/ml olarak tesbit etmişlerdir. Çalışmamızda rifampisin'in MİK aralığını 0.094-3 µg/ml olarak bulduk. Tablo 23'de diğer çalışmacıların rifampisin için buldukları MİK değerleri ile kendi çalışmamızda bulduğumuz MİK değerleri gösterilmektedir.

Tablo 23. Rifampisin ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK değerleri

Çalışmacılar	Çalışmanın yöntemi	MİK (µg/ml)
Bosch ve ark. (47)	Agar dilüsyon	0.12-4.0
Khan ve ark. (44)	Broth dilüsyon	0.02-2.5
Rubinstein ve ark. (48)	Zamana bağlı ölüm	4
Ariza ve ark. (49)	Agar dilüsyon	0.5-2.0
Akova ve ark. (46)	Broth dilüsyon	0.03-1.0
Sümerkan ve ark. (51)	Agar dilüsyon	1-4
Evrensel (50)	Agar dilüsyon	0.5-4
Çalışmamızda	E-Test	0.094-3

Evrensel (50), 42 *B. melitensis* suşuna karşı doksisisiklin duyarlılığında MİK aralığını 0.06-1 µg/ml, MİK₉₀ değerini 0.25 µg/ml olarak bulmuştur. Akova ve ark.'nın (46), 49 *Brucella* suşu ile yaptıkları doksisisiklin duyarlılık çalışmasında MİK aralığını 0.03-0.5 µg/ml ve MİK₉₀ değerini 0.5µg/ml olarak bulmuşlardır. Bosch ve ark.'nın (47), 95 *B. melitensis* suşu ile yaptıkları doksisisiklin duyarlılık çalışmasında % 100'ünün 0.25 µg/ml'de inhibe olduğunu saptamışlar ve tetrasiklinler içerisinde en aktif antibiyotiğin doksisisiklin olduğunu bildirmişlerdir. Ariza ve ark.'nın (49), 81 *B. melitensis* suşuna karşı doksisisiklin ile yaptıkları duyarlılık çalışmasında MİK aralığını 0.06-0.25 µg/ml ve MİK₉₀ değerini 0.25 µg/ml olarak saptamışlardır. Sümerkan ve ark.'nın (51), 52 *B. melitensis* suşuna yaptıkları duyarlılık çalışmasında doksisisiklinin MİK değerlerini 0.03-1 µg/ml arasında bulmuşlar, MİK₉₀ değerini 0.5 µg/ml olarak tesbit etmişlerdir. Çalışmamızda doksisisiklin'in MİK aralığını 0.094-1 µg/ml olarak bulduk. Tablo 24'de daha önce doksisisiklin için yapılan çalışmalarda bulunan MİK değerleri ile kendi çalışmamızda bulduğumuz MİK değerleri gösterilmektedir.

Tablo 25. Trimetoprim/sülfometaksazol ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK değerleri

Çalışmacılar	Çalışmanın yöntemi	MİK (µg/ml)
Khan ve ark. (44)	Broth dilüsyon	5-25
Sümerken ve ark. (51)	Agar dilüsyon	0.5-9.5
Çalışmamızda	E-Test ile	0.016-0.125

Göktaş ve ark. (53), 8 *B. melitensis* suşuna çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının etkinliklerini araştırmışlar ofloksasin+rifampisin ve ofloksasin+doksisiklin kombinasyonlarında invitro sinerjizm görülmezken, siprofloksasin+doksisiklin, siprofloksasin+rifampisin, doksisiklin+rifampisin kombinasyonlarında aditif etki saptamışlardır.

Çalışmamızda rifampisin+ trimetoprim/sülfometoksazol kombinasyonu için MİK değerlerini 0.002-0.125 µg/ml arasında bulduk. Rifampisin+trimetoprim/sülfometoksazol kombinasyonu için yaptığımız FİK index hesaplamasında 24 (%54) suşda invitro sinerjizm, 17(% 39) suşda indeferens ve 3 (%7) suşda parsiyel sinerjizm saptadık. Doksisiklinin yan etkileri nedeniyle rifampisin+doksisiklin kombinasyonun kullanılmadığı hasta gurubunda rifampisin+ trimetoprim/sülfometoksazol kombinasyonun kullanılabileceğini düşünüyoruz.

Khan ve ark. (44), streptomisin için MİK değerini 0.15-5.0 olarak bulmuşlardır. Sümerkan ve ark.'nın (54), 52 *B. melitensis* suşuna yaptıkları duyarlılık çalışmasında streptomisin için MİK değerleri 0.25-4 µg/ml, MİK 90 değeri ise 2µg/ml olarak bulunmuştur. Gür ve ark. (54), 42 *B. melitensis* suşu için broth mikrodilüsyon yöntemiyle streptomisin için MİK değerini 256µg/ml, E test ile 256-128 µg/ml arasında bulmuşlardır.

Yaptığımız çalışmada streptomisin'in MİK aralığını 0.016-3 µg/ml arasında bulduk. Tablo 26'da daha önce streptomisin için yapılan çalışmalarda bulunan MİK değerleri ile kendi çalışmamızda bulduğumuz MİK değerleri gösterilmektedir.

Tablo 26. Streptomisin ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK değerleri

Çalışmacılar	Çalışmanın yöntemi	MİK (µg/ml)
Khan ve ark. (44)	Broth dilüsyon	0.15-5.0
Gür ve ark. (54)	Broth dilüsyon	256
Gür ve ark. (54)	E-Test	256-128
Sümerken ve ark. (51)	Agar dilüsyon	0.25-4
Çalışmamızda	E-Test	0.016-3

Streptomisin+doksisiklin kombinasyonu için 44 *B. melitensis* suşunda MİK değerlerini 0.019-0.125 µg/ml arasında bulduk.Yapılan FİK index hesaplamalarında 27 (% 62) suşda invitro sinerjizm saptadık. Tablo 21' de görüldüğü gibi 1 (% 2) suşda antagonizma saptadık.

Çalışmamızda trimetoprim/sülfometoksazol +doksisiklin kombinasyonu için MİK değerlerini 0.002-0.125 µg/ml arasında bulduk. Bu kombinasyon için yapılan FİK index hesaplamalarında 17 (% 38) suşda sinerjizm saptadık. Çalışmaya aldığımız tüm kombinasyonlar içerisinde en düşük sinerjizm bu kombinasyonda görülmüştür. En yüksek oranda indeferens de 23 (% 53) suşla bu kombinasyonda bulunmuştur. Yapılan istatistiksel çalışmada bu kombinasyonda anlamlı yüksek fark bulundu (Tablo 7).

Klasik tedavide kullanılan antibiyotiklerle, kinolon ve makrolidlerin kombinasyonu ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Bazı makrolidlerin invitro duyarlılık çalışmalarında *Brucella* bakterisine karşı etkin antibiyotik olduklarını bildiren çalışmalar mevcuttur (55,56). Garcia Rodriguez ve ark.'nın (55), yaptığı çalışmada *Brucella* bakterisine karşı en etkili makrolidin azitromisin ve klaritromisin olduğunu saptamışlardır. Landinez ve ark.'nın (56), yaptıkları bir çalışmada 358 *B.melitensis* suşuna karşı azitromisinin MİK aralığını 0.03-2.0 µg/ml olarak bulmuşlardır. Benzer bir çalışmayı Garcia Rodriguez ve ark. (55), yapmış ve azitromisin için MİK aralığını 0.1-4.0 µg/ml olarak bulmuşlardır. Evrensel (50), yaptığı çalışmada azitromisin için MİK aralığını 0.5-32µg/ml olarak bulmuştur. Çalışmamızda azitromisin için MİK aralığını 0.25-8 µg/ml olarak bulduk. Tablo 27'de daha önce azitromisin için yapılan çalışmalarda bulunan MİK değerleri ile kendi çalışmamızda bulduğumuz MİK değerleri gösterilmektedir.

olarak bulduk. Tablo 28'de daha önce siprofloksasin için yapılan çalışmalarda bulunan MİK değerleri ile kendi çalışmamızda bulduğumuz MİK değerleri gösterilmektedir.

Tablo 28. Siprofloksasin ile yapılan çeşitli çalışmalarda alınan MİK değerleri

Çalışmacılar	Çalışmanın yöntemi	MİK (µg/ml)
Bosch ve ark. (47)	Agar dilüsyon	0.12-0.5
Khan ve ark. (44)	Broth dilüsyon	1.25-2.5
Doğanay ve ark. (57)	Agar dilüsyon	0.125-0.25
Sümerkan ve ark. (51)	Agar dilüsyon	0.06-0.5
Evrensel (50)	Agar dilüsyon	0.25-1.0
Çalışmamızda	E-Test	0.016-1.0

Yapmış olduğumuz azitromisin+siprofloksasin kombinasyonun duyarlılık çalışmasında 37 (% 85) suşla sinerjizm görülmüştür. İki suşta antagonizma saptanmış, bu kombinasyonda indeferens bulunamamıştır. RİF+DOX kombinasyonundan sonra bu kombinasyonda istatistiksel olarak fark anlamlı düşük bulunmuştur (Tablo 7).

Gerek ülkemizde gerekse yurt dışında yapılan çalışmalarda kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasinin *B. melitensis* suşları üzerine iyi bir invitro etkinlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Yaptığımız çalışma sonuçları da bunu destekler niteliktedir.

Sonuçlarımız bize rifampisin + doksisisiklin, streptomisin + doksisisiklin ve azitromisin+siprofloksasin kombinasyonlarının in vitro sinerjizm gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçların klinik yanıtının aynı paralelde olup olmayacağını bilemiyoruz. Çünkü burada ilaçların in vivo etkilerini etkileyen diğer parametreler belirleyici olur. Bu parametreler antimikrobiyallerin hücre içerisine yeterli düzeyde girip girmemesi, ortamın pH'sı, ilaçların biyoyararlanımı gibi özetlenebilir.

Ortaya çıkan tabloda görülüyor ki, *B. melitensis* tedavisinde en etkili kombinasyon rifampisin+doksisisiklin ve azitromisin+siprofloksasin kombinasyonudur. Rifampisin+doksisisiklin kombinasyonu ile 41 (%93) suşta sinerjizm saptanmıştır. Azitromisin+siprofloksasin kombinasyonunda sinerjizm saptanan suş sayısı 37 (% 84) olup bu kombinasyonu 27 (% 61) suşla streptomisin+doksisisiklin kombinasyonu izlemiştir (Tablo 21). E test ile yapılan bu çalışma, *Brucella* bakterileri için antimikrobiyal duyarlılık

testlerinin yapılabilceğini ve çok fazla bir alt yapı gerektirmeden her yerde kullanılabilceğini göstermiştir.

Bruselloz tedavisinde, ileride kullanıma girecek olan, hücre içerisine iyi penetre olan antibiyotiklerle benzer çalışmaların tekrarlanması gerekecektir. Bu tür çalışmalar hayvan deneyleri ile desteklenmelidir. Nüksler de düşünöldüğünde bruselloz tedavisinde etkili olan antibiyotik araştırmaları için halen açık bir alandır.

Genelde klasik bruselloz tedavisinde kullanılan antimikrobikler pediatrik yaş grubu için çeşitli nedenlerle istenmeyen etkiler oluştururlar. Özellikle ülkemizin de içerisinde bulunduğu coğrafyada bruselloz'un yaygınlığı olduğu göz önünde bulundurulursa, pediatrik yaş grubu için yeni antimikrobiyal kombinasyonların çalışılmasının gerekli olduğunu düşünüyoruz.

7. ÖZET

Gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olan bruselloz, aynı zamanda ciddi düzeyde ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Uzun zamandır bilinen bir hastalık olmasına rağmen en etkili tedavi protokolü henüz belirlenememiştir. *Brucella*'lar hücre içi mikroorganizmalar olduklarından eradikasyonları güçtür ve relapslar sıklıkla görülmektedir.

Çalışmamızın amacı 1999-2001 döneminde hastanemizde değişik klinik örneklerden izole edilen 44 adet *Brucella* suşunun tiplendirilmesi ve bu bakterilere rifampisin + doksisisiklin, rifampisin + trimetoprim/sülfometoksazol, trimetoprim/sülfometoksazol + doksisisiklin, streptomisin+doksisisiklin, azitromisin+siprofloksasin kombinasyonlarının in vitro duyarlıklarının test etmektir.

Test yöntemi olarak, kolay uygulanması, fazla alt yapıya ihtiyaç göstermemesi, kombinasyon şeklinde çalışıyor olması ve MİK değeri veriyor olması nedenleriyle E test yöntemini seçtik. Çalışmamızda, DSÖ'nün de önerdiği rifampisin + doksisisiklin kombinasyonunu *B. melitensis* suşlarına en etkili antibiyotik kombinasyonu olarak tespit edilmiştir. Bu kombinasyonun kullanılmadığı durumlarda azitromisin + siprofloksasin kombinasyonu güvenle kullanılabilir düşüncesindeyiz.

8. ABSTRACT

Brucellosis is an important health care problem in developing countries and causes significant economic loss. Although it's a well known disease since ancient times, its effective therapy protocol has not been established yet. Because of brucellae are located intracellularly, the organisms are not readily eradicated from the host and relapses are seen frequently.

The aim of this study was to type the 44 isolates of brucellae recovered from various clinical specimens from 1999 through 2001, and to test the susceptibilities of these isolates against rifampicin+doxycycline, rifampicin+trimethoprim/sulfamethoxazole, trimethoprim/sulfamethoxazole+doxycycline, streptomycin+doxycycline and azitromycin+ciprofloxacin in vitro.

E test method was used for antimicrobial susceptibility testing because it's easy to apply, it can be used with antibiotic combinations and allows quantitative determination of MIC's. Rifampicin+doxycycline combination was found to be the most effective therapeutic against *B. melitensis* isolates as indicated by the WHO (World Health Organisation). Combination of azitromycin+ciprofloxacin can be used confidently when the above mentioned combination cannot be used.

9.KAYNAKLAR

1. Young EJ. *Brucella species*. In: Mandell G, Bennett JI, Dolin R (eds) Principles and Practice Infectious Diseases. New York ,Churchill, Livigstone, 2000: 2386-2393.
2. Roux J. Public Healt Importance of Brucellosis. In: Tümbay E, Hilmi S, Anđ Ö, *Brucella* and Brucellosis In Man and Annals , Publication of the Turkish Microbiological Society Turkey 1991: 3-10.
3. Akdeniz H, Irmak H, Buzgan T, Karahocagil M K, Demiröz A P. Hayvancılıkla Uğraşan Bir Ailede *Brucella Melitensis*'e Bağlı Panstopeniyle Karakterize Aile İçi Brucelloz: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi; 2000: (30) 26-29
4. Badur S. Brucellozda Serolojik Tanı Ve Seroepidemioloji: Klimik Dergisi 1990: 3(1) 17-20.
5. Çevik M A. Brucelloz Epidemiyolojisi: Ankem Dergisi 15 (No.3) 2001: 568-570
6. Çelebi S, Babacan M, Tuncel E, Ayyıldız A. Erzurum Yöresinde İnaparan Bruselloz Prevalansı: İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 1991: 5(3)175-176
7. Gutuzo E, Carrillo C: *Brucella*, "Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds): Infectious Diseases (2th ed) Philadelphia ,WB Saunders Company, 1998:1837
8. Akova M. Brusellozis Tedavisi: Ankem Dergisi 2001: 15 (No.3): 575-576

10. Taşova Y, Saltoğlu N, Şahin G, Aksu HS. Osteoarthricular involvement of brucellosis in Turkey. *Clin Rheumatol*, 1999:214-219.
11. Baysal B. Brusella: Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö; *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara, Güneş Kitapevi, 1999:571-577.
12. Sözen TH. Bruselloz: Wilke A, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları, Nobel Tıp Kitapevi*, 1996 : 486-491.
13. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi 10. Baskı İzmir, 2000:199-214.
14. Moyer NP, Holcomb LA, Hausler WJ. *Brucella* In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds), *Manuel of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology Press: Washington DC 1991:457-462.
15. Dilmener M. Bruselloz'un klinik prezantasyonları; *Klimik Derg*, 1990 3 (1): 23-25.
16. Sırmatel F. Brusellozis: X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı, Adana, 15-19 Ekim, 2001: 33-35.
17. Demirkan F Akalın HE, Şimşek H, Özyılkan E, Telatar H. Spontaneous peritonitis due to *Brucella melitensis* in a patient with cirrhosis: *Eur J Clin Microbiol Infecti Dis*: 1993: 12 –66.
18. Fiori PL, Mastrandrea S, Rapelli P, Cappuccinelli P. Rucella abortus Infection acquired in Microbiology laboratories: *Journal of Clinical Microbiology*, 2000: 38, 2005-2006.
19. Kayser FH, Kurt AB, Ecker J, Zinkernagel RM. *Brucella* (Bruselloz ve Malta Humması),*Tıbbi Mikrobiyoloji*, (Çev. MA Küçüker , E Tümbay, Ö Anđ, Z Erturan) Anlamak– Öğrenmek-Başvurmak için, Gözden geçirilmiş ve genişletilmiş 9. Baskı; Nobel Tıp Kitapevler; 2002:314-315.
20. Hall WH, Khan MY. Brucellosis. In: *Infectious diseases*, Hoeprich PD, Jordan MC; 1989:1282-1288.

21. Bilgehan H, Klinik Mikrobiyolojik Tanı: Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi, 2. Baskı İzmir 1995: 226-229.
22. Gültekin M. Brucellozun Laboratuvar Tanısındaki Sorunlar Ve Türkiye'deki Epidemiyolojisi: XXVIII.Türk Mikrobiyolojisi Kongresi 4-9 Ekim 1998: 125-126.
23. P.Yagupsky. Detection of *Brucellae* in blood cultures. J Clin Microbiol, 1999; 37 (11): 3437-3442.
24. LETTERS TO THE EDITOR: Direct Urease Test on BACTEC Blood cultures: Early presumptive diagnosis of Brucellosis in an area of endemicity: J Clin Microbiol, 2000: 38 (4):1706-1706.
25. RM Bannaty, MC Jackson and Z Memish. Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. J Clin Microbiol, 1997;35 (10); 2673-2674.
26. Yagupsky P, Peled N, Press J, Abramson O, Abu-Rashid M. Comparison of BACTEC 9240 Peds Plus medium and isolator 1.5 microbial tube for detection of *Brucella melitensis* from blood cultures: J Clin Microbiol, 1997; 35 (6); 1382-1384.
27. Ruiz J, Lorente I, Perez J, Simarro E, Martinez-Campos L. Diagnosis of brucellosis by using blood cultures: J Clin Microbiol,1997;1 35 (9); 2417-2418.
28. Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by periheral-blood PCR assay. J Clin Microbiol, 1997; 35 (3); 2927-2930.
29. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol, 1995; 33 (3); 615-617.
30. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1,2,and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* bv.1 PCR. J Clin Microbiol, 1994; 32 (11); 2660-2666.
31. Öztürk R. *Brucella*:Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı kitabı, 11-12 Nisan 1997, Gür D, Söyletir G, Bal Ç, Dündar V, Sümerkan B, Köksal İ, Çiftci U (eds), Turgut yayıncılık, İstanbul 1997; 56-64.
32. Sümerkan B. *Brucella* bakterilerinde in-vitro antibiyotik duyarlılığı: Ankem Der, 2001; 15 (No.3): 571-574.

33. Gülay Z. Antibiyotik duyarlılık testlerinin hasta izleniminde kullanımı: Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğini ölçen testler; Gür D, Söyletir G, Bal Ç ve ark.; Antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyon toplantısı, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları 11-12 Nisan Turgut yayıncılık, İstanbul 1997;56-64.
34. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Miscellaneous fastidious Gram-negatif bacilli In. Diagnostic Microbiology. JB Lippincott Company Philadelphia , 1992; 651-656.
35. Keskin K. Yeni bir antibiyotik duyarlılık testi: E Test. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 7-10 Mayıs 1996, Kongre Kitabı, Ağaçfıdan A, Badur S, Külekçi G, (eds), Turgut Yayıncılık, İstanbul, 1996;48-51.
36. İnce D, Dilmener M. Bruselloz tedavisi: Ülkemizde Hangi Kombinasyonu Tercih etmeliyiz?: Flora Der. 1997; (1) 12-15.
37. Kayaalp S.O. Kemoterapotiklere giriş, İnfeksiyon Tedavisinin Farmakolojik ve Farmakokinetik Esasları: Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji; Cilt 1 (9. Baskı) Hacattepe-Taş Yayınları, Ankara 2000; 175-200.
38. Kayaalp S.O. Sulfonamidler, Ko-Trimoksazol ve Trimetoprim: Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji; Cilt 1 (9. Baskı) Hacattepe-Taş Yayınları, Ankara 2000; 283-290.
39. Kayaalp S.O. Aminoglikozidler. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji; Cilt 1 (9. Baskı) Hacattepe-Taş Yayınları, Ankara 2000; 258-267.
40. Kayaalp S.O. Fluorokinolonlar: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji; Cilt 1 (9.Baskı) Hacattepe-Taş Yayınları, Ankara 2000; 276-282.
41. Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. Microbiology: In. Lippincott's eustrated Reviews Series Edditors: Harvey RA, Champe PA. Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 201-202
42. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, Twenty Second Edition, 2001; 246-249.

43. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Miscellaneous fastidious Gram-negatif bacilli In: Diagnostic Microbiology. JB Lippincott Company Philadelphia 1992;303-349.
44. Khan MY, Dizon M, Kiel FW. Comparative in vitro activities of ofloxacin, difloxacin, ciprofloxacin and other selected antimicrobial agents against *Brucella melitensis*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33(8), 1409-1410.
45. Colmenero JD, Fernandez-Gallardo LC, Agundez JAG, Sedeno J, Betinez J, Valverde E. Possible implications of doxycycline-rifampin interaction for treatment of brucellosis. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(12), 2798-2802.
46. Akova M, Uzun Ö, Akalın HE, Hayran M, Ünal S, Gür D. Quinolones in treatment of human brucellosis: Comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. Antimicrob Agents Chemother 1993; (37), 1831-1834.
47. Bosch J, Linares J, Lopez de Goicoechea MJ, Ariza J, Cissal MC, Martin R. In vitro activity of ciprofloxacin, ceftriaxone, and five other antimicrobial agents against 195 strains of *Brucella melitensis*. J Antimicrobial Chemother 1986; 17(4), 459-461.
48. Rubinstein E, Lang R, Shasha B, et al. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35(9), 1925-1927.
49. Ariza J, Gudiol F, Pallares R, et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin. Ann Intern Med 1992; 117 (1), 25-30.
50. Evrensel N. *Brucella* Klinik İzolatlarının Tiplendirilmesi Ve Çeşitli Antimikrobiyal Kombinasyonlara İn Vitro Duyarlılıkları: Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri. 1996; 28-34.
51. Sümerkan B, Doğanay M, Bakışkan V, Fazlı ŞA, Aygen B. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Brucella melitensis*. Tübitak yayınları, Doğa-Tr, J, Med Sci 1993; 18, 17-22.
52. Akova M, Gür D, Kocagöz T, Livermore D. *Brucella melitensis*'e karşı çeşitli antibiyotiklerin ve kombinasyonların farklı pH değerlerinde etkinliği. Ankem Der.1995: 136.

53. Göktaş P, Şimşek S, Coşkun D. *Brusella melitensis*'e karşı kinolon-doksisiklin, kinolon-rifampisin kombinasyonlarının in vitro etkinliğinin karşılaştırması. 5. Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, İstanbul 4-6 Eylül 1995; 50.
54. Gür D, Kocagöz S, Akova M, Ünal S. Comparison of E Test to Microdilution for Determining In Vitro Activities of Antibiotics against *Brucella melitensis*, Letters to the Editor: Antimicrob Agents Chemother ,1999; 43 (9), 2337.
55. Garcia-Rodriquez JA, Bellido JLM, Fresnadillo MJ, Trujillano I. In vitro activities of new macrolides and rifapentine against *Brucella* spp. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37, 911-913.
56. Landinez R, Linares J, Loza E, Beltran JM, Martin R, Baquero F. In vitro activity of azithromycin and tetracycline against 358 clinical isolates *Brucella melitensis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11(3), 265-267.
57. Doğanay M, Aygen B. Use of ciprofloxacin in the treatment of brucellosis Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 74-75.