

T.C
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları
Anabilim Dalı

BRUCELLA SUŞLARINDA MIC YÖNTEMİYLE DUYARLILIK ARAŞTIRMASI

**UZMANLIK TEZİ
Dr. ONUR KAYA**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. GÜLER YAYLI**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
574 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2005-İSPARTA

ÖNSÖZ

Asistanlık dönemim boyunca yetişmemde emeği geçen, bana araştırma olanağı sağlayan ve çalışmamın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güler YAYLI'ya, yardımlarını gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKÇAM'a, çalışmamın başından sonuna kadar tüm aşamalarında desteklerini esirgemeyen başta kader arkadaşım Dr. İbak GÖNEN olmak üzere bölümümüzdeki diğer asistan arkadaşlarıma, bilgisini ve emeğini, ihtiyaç duyduğum her an bana sunan Dr. Ozan YILMAZ'a, her zaman manevi desteklerini üzerimde hissettiğim anneme ve babama, sıkıntılı dönemlerimde bana büyük destek veren eş ruhum Özge YILDIZ' a, özellikle de şu an bir yerlerden beni izlediğini bildiğim varlığını her zaman kalbimde hissedecek olduğum canım kardeşim rahmetli Ahmet Bora KAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım....



İÇİNDEKİLER

Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Kısaltmalar	iv
Tablolar	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	2
2.1. Bruselloz	2
2.1.1. Tarihçe	2
2.1.2. Etkenin Özellikleri	3
2.1.2.1. Kültür Özellikleri	3
2.1.2.2. Dirençlilik	4
2.1.2.3. Antijenik yapı	4
2.1.3. Patogenez	5
2.1.4. Klinik	6
2.1.5. Komplikasyonlar	8
2.1.6. Tanı	13
2.1.6.1. Görüntüleme Yöntemleri	13
2.1.6.2. Bakteriyolojik yöntemler	14
2.1.6.3. Serolojik Tanı	15
2.1.6.3.1. Standart Tüp Aglutinasyonu	15
2.1.6.3.2. Coombs Serumu Testi	16
2.1.6.3.3. Opsonositofajik Test	16
2.1.6.3.4. Rose-Bengal	17
2.1.6.3.5. EIA	17
2.1.6.3.6. PCR	17
2.1.7. Tedavi	18
3. MATERYAL	20
4. METOD	22
4.1. İzolasyon yöntemi	22
4.2 Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması	23
4.3. İnokulumun Hazırlanması	24
4.4. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	24
5. BULGULAR	25
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	27
ÖZET	33
SUMMARY	34
KAYNAKLAR	35

KISALTMALAR

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CFU: Colony Forming Unit

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

EIA: Enzim Immun Assay

ELİSA:Enzim Linked Immununosorbend Assay

Ig G: İmmunglobulin G

Ig M: İmmunglobulin M

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

mg: Miligram

ml: Mililitre

MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

MİK₅₀:Bakterilerin %50' sinin üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon

MİK₉₀: Bakterilerin %90' nın üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RES: Retikuloendotelyal Sistem

STA: Standart Tüp Aglutinasyonu

TNF: Tümör Nekrosis Faktör

TABLolar

Tablo 1	Brusellozun formları	8
Tablo 2	Kullanılan antibiyotiklerin çözücü ve sulandırıcıları	23
Tablo 3	Antibiyotiklerin MİK aralıkları ve MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	26



1. GİRİŞ

Brucella cinsi bakteriler ile oluşan bruselloz (Malta humması, Bang's hastalığı, Akdeniz ateşi, Mal hastalığı) aslında bir hayvan hastalığı (koyun, keçi, sığır, manda, domuz) olup bunların sütleri, etleri, idrar, vücut sıvıları, gebelik materyalleri ve süt ürünleri aracılığı ile insanlara bulaşan bir hastalıktır (1). Hastalık dünyada yaygın olarak görülmekle birlikte Akdeniz ve Güney Amerika ülkelerinde daha sık görülmektedir (2). Ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu' da kontrolsüz hayvan ürünlerinin tüketiminin yaygınlığından dolayı bazen hastalığın epidemi boyutuna ulaştığı görülmektedir (3). Hastalığın mortalitesi düşüktür ancak yüksek morbiditesi nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (4). Hastalık farklı klinik tablolarla ortaya çıkabildiğinden tanıda zorluklara neden olmaktadır. Hücre içi yaşayan bir bakteri olmasından dolayı tedavi seçenekleri sınırlıdır. Etkin bir tedavi için hücre içinde yüksek konsantrasyon düzeylerine ulaşan antibiyotikler seçilmeli ve tedaviye uzun bir süre devam edilmelidir (5).

Isparta bruselloz açısından endemik bir bölgedir. Süleyman Demirel Üniversitesi Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları servisinde yatarak tedavi gören bruselloz olgularının bir çoğu daha önce tedavi aldıkları halde iyileşme görülmemiş veya komplikasyon gelişmiş olgulardır. Bu nedenle bu hastalardan elde edilen Brucella melitensis suşlarında antibiyotik dirençlerinin MİK yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bruselloz

2.1.1. Tarihçe

Bruselloz ilk kez Hippocrates tarafından ' humma ' olarak tanımlanmıştır. Halsizlik, yorgunluk, ateş, zayıflama, kaslarda bitkinlik belirtileri ile seyreden hastalık ilk kez 1861' de Marston tarafından "gastric remittent fever" olarak tanımlanmıştır (6). Hastalığın etkeni ise ilk kez 1887 yılında Sir David Bruce tarafından Malta Adasında ' Malta humması ' adı verilen hastalıktan ölmüş İngiliz askerlerinin dalağında izole edilmiş, *Brucella melitensis* olarak isimlendirilmiştir. 1904 yılında, bu bakterinin kaynağının keçi ve ineklerin süt ve idrarları olduğu, etkenin bu ürünlerde izole edilmesi ile ortaya konulmuştur. 1897 yılında Danimarka' da Bang tarafından doğum yapan sığırların uterus duvarı salgısından *Brucella abortus* izole edilmiştir. 1914 yılında ise ABD' de Traum, premature doğan domuz yavrularının karaciğer, böbrek ve midelerinden *Brucella suis*' i saptamıştır. Ardından Rusya ve Alaska' da ren geyiğinden *Brucella rangiferi* tarandı, ABD' de orman kenesinden *Brucella neotomae*, Avustralya ve Yeni Zelanda' da da epididimitisli koçlardan *Brucella ovis*' in izole edilmeleri izlemiştir. 1966 yılında Carmichael köpeklerde *Brucella canis*' i saptamıştır. 1970' lerde ise ilk kez bir kadın hastadan *Brucella canis* izole edilmiştir. Ülkemizde ise 1. Dünya Savaşı sırasında Hüsamettin Kural ve Mahmut Akalın tarafından *Brucella melitensis*'; 1931' de Zühtü Berke sığırlardan, 1943' de Golem, 1944' de ise Köylüoğlu ve Aktan koyun ve keçilerden *Brucella cinsi* mikroorganizmaları izole etmişlerdir (1).

2.1.2. Etkenin özellikleri:

Brucella cinsindeki bakteriler 0.5-0.7 µ eninde, 0.6-1.5 µ boyunda gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, aerop, çok küçük ince kokobasil şeklindedirler. Üreaz aktiveleri değişken olup karbohidratları fermente etmezler. Gram boyama sırasında zıt boyayı güç almalarından dolayı en az 3 dakika bu boyada bırakılmalıdır (2,6,7,8).

Brucella cinsindeki bakteriler zorunlu aeroptur. CO₂ ile üremeleri artar. Özellikle B. abortus ilk izolasyonda % 5-10 CO₂' li ortama ihtiyaç duyar (1,9,10). Etkenin klinik örneklerden izolasyonu için kan veya serumla zenginleştirilmiş besiyerlerinde 30 gün veya daha fazla inkübasyon süresi gerekebilir (11). Küçük olmalarından dolayı moleküler hareketleri nedeniyle yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). Tek olarak daha az sıklıkla ikili, kısa zincirler veya küçük kümeler halinde bulunurlar (12).

Brucella spp. grubu bakteriler katalaz olumlu, B. ovis ve B. neotomae dışında da oksidaz olumludurlar. Metil kırmızısı testi olumsuzdur. Üreaz aktiviteleri değişken olup sitrat deneyi ve ONPG (Orthonitrophenyl – beta – D- galactopyranoside) negatiftir. İndol oluşturmazlar. Karbohidratlardan asit ve gaz yapmazlar ancak glikozu az miktarda kullanırlar. H₂S oluşumu değişkendir (10) . Nitratları nitritlere indirgerler.

Brucella cinsindeki bakteriler kültürel, metabolik, antijenik karakteristiklerine göre 7 türe ayrılmıştır. Bununla birlikte DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına göre suşlar arasında % 95' in üzerinde benzerlik gösterilmiştir (12). Brucella abortus, B. suis, B. canis ve özellikle de B. melitensis insanlarda infeksiyona yol açar (2).

2.1.2.1.Kültür özellikleri:

Brucella türleri hücre içi ortamda yaşadıklarından dolayı beslenme gereksinimleri karmaşıktır. İlk izolasyonda kompleks besiyerlerinin kullanılması gerekir. Et özeti, triptoz gibi kompleks peptonlu, glikoz ve tuz içeren besiyerlerinde iyi ürerler. Genellikle ilk izolasyonda geç ürerler. Üremeleri için besiyerlerine tiamin, niasin, biotin, nikotinik asit, bazen serum

eklemek gerekir. Optimal üreme ısısı 37 °C olup 10-40 °C arasında üreyebilir. Optimal pH' ı 6.7-7.4' tür. Kolonileri inkübasyondan 2-3 gün sonra görülebilir. Fakat 4-5 gün sonra 2-3 mm. çapa ulaşırlar. Jelozdaki kolonileri küçük, yuvarlak, kabarık, saydam, şebnem tanesine benzeyen kaygan ve S tipindedirler. Oluşan bu koloniler hemolizsiz, pigmentsizdir. Eski kültürlerde B. melitensis ve B. abortus' un kolonileri esmer-kahverengi renk alabilirler. Eski kültürlerde R tipi koloniler meydana getirirler. B. canis ve B. ovis' in kolonileri R formunda diğer türlerin kolonileri S formundadır (1).

2.1.2.2. Dirençlilik:

Brucellalar 60 °C de 10 dakikada, % 1 fenol eriyiğinde ise 15 dakikada canlılıklarını yitirirler. Sütte 17 gün, tereyağında 142 gün, dondurmalarda 1 ay, çeşme suyunda 8 °C de 57 gün, 25 °C de ise 10 gün canlı kalabildiği; insan idrarında en az 7 gün canlı kalabildiği bildirilmiştir. Bakteri toprakta 10 haftaya kadar, sıvı gübrede 2 yıla kadar, keçi peynirinde +4 ile +8 °C' de 180 güne kadar ve içme suyunda 60 güne kadar canlılığını korur. Isıya çok duyarlıdır, pastörizasyon yeterli korunma sağlar (12).

2.1.2.3. Antijenik yapı:

B. melitensis, B. abortus ve B. suis, A ve M olmak üzere ısıya dayanıklı, aglutinasyon reaksiyonlarından sorumlu 2 çeşit yüzey antijeni bulundururlar. B. abortus ve B. suis' de A antijeni fazla, M antijeni az miktarda; B. melitensis' de ise M antijeni fazla, A antijeni az miktardadır. Bu nedenle serolojik metodlar ile B. melitensis' i B. abortus ve B. suis' den ayırmak mümkün olmakta ancak B. abortus' u B. suis'den ayırmak mümkün değildir.

Bunun yanında Brucellaların Salmonellalardaki Vi antijenlerine benzer L antijenleri vardır. Bu antijen genelde B. abortus suşlarında olup yeni izole edilen bakterilerde vardır ve immun serumlarla aglutinasyonuna engel olmaktadır. Bu durum serumların 100 °C de yarım saat ısıtılması ile ortadan kalkar (12).

2.1.3. Patogenez :

Bruselloz özellikle Güney Amerika ve Akdeniz ülkelerinde olmak üzere dünyada sık görülen bir zoonozdur (2). Mezbahane çalışanları, veterinerler, laboratuvar çalışanları hastalık açısından risk altındaki meslek gruplarıdır. *B. melitensis* genellikle infekte hayvanlardan elde edilen pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri ile ağızdan alınır. Mide asiditesine *B.abortus'* a oranla daha dayanıklıdır. Diğer giriş kapıları ise deri, konjunktiva ve bakterilerle kontamine tozlar aracılığı ile solunum yoludur. Kuluçka dönemi yaklaşık 2-3 haftadır. Bu süre alınan bakteri sayısı ve vücuda giriş yoluna bağlı olarak değişebilir . Bölgesel lenf bezlerinde çoğalan bakteriler kan yoluyla yayılarak karaciğer, dalak, lenf bezleri, kemik iliği, böbrek , endokard, kemik, eklem, periton, akciğer gibi organlara yerleşmeye eğilimlidirler (8,13,14,15,16).

Brucella ağız mukozasından girerse lenf yolları ile boğaz lenf yollarında, barsak mukozasından geçerse mezenter lenf bezlerinde, konjunktiva ve deriden girerse bölgesel lenf nodullerinde yerleşir. Daha sonra duktus yolu ile kana karışarak bakteriyemiye neden olur ve lenf bezleri, karaciğer, kemik iliği ve diğer RES de 0.2-2 mm. çapında ufak nodül şeklinde foküsler yaparlar. Bakteriler fagositler içinde kendilerini hem oluşan antikorlardan hemde antibiyotiklerin etkisinden korurlar. İnfeksiyonun bu patogenezine uygun olarak, subakut ve kronik bir gidişi vardır. Kan kültüründen genellikle olumsuz sonuç alınması *Brucellaların* kan içinde serbest halde bulunmaması nedeni ileler. Brusellozun komplikasyonlarında oluşan steril abselerin infeksiyonun vücutta meydana getirdiği alerji ve otolizden dolayı ortaya çıktığı bildirilmiştir. Nekropside gözle görülebilen ciddi bir doku değişimi yoktur. Dalak büyümüş, kanlı ve yumuşaktır. Karaciğerde aynı bulgular nadirdir (1).

Normal insan serumu bazı *Brucella* türlerine karşı bakterisit etki gösterir ve polimorf nüveli lökositler tarafından fagosite olmaları için opsonize eder. *B. melitensis* serumun bakterisit etkisine karşı dirençlidir ve bu da diğer türlere oranla daha virülan olma nedenini açıklar (17). *Brucellalar* fakültatif hücre içi parazitidirler. Smooth lipopolisakkarite sahip *Brucella* bakterisi, olmayana göre polimorfonukleer ve mononukleer lökositler içerisinde daha

kolay canlılığını sürdürür. Bakterinin hücre içinde canlılığını sürdürmesinde poly N-formyl perosamine O zinciri, Cu-Zn superoxide dismutaz eritroz fosfat dehidrogenaz içermesi ve stresle indüklenebilir proteinleri salgılamasının rolü olabileceği düşünülmektedir. En önemli virülans faktörü ise nötrofillerde miyeloperoksidaz – H₂O₂ sistemini baskılayan, TNF üretimini inhibe eden, makrofajlarda fagozom-lizozom füzyonunu engelleyen ve oksidatif hasara karşı koruyan bazı maddeler (adenin ve guanin monofosfat) sentezlemesidir (11-13). S-LPS, antikor yanıtında ve brucellanın vürülansında en önemli yer tutan bir yapıdır. S-LPS içermeyen suşlar normal serum tarafınca lizise uğratılmaya çok duyarlıdır. S-LPS' e karşı oluşan antikorlar Brucellanın izole edilemediği durumlarda tanıda kullanılır. Brucellaya karşı oluşan antikorların ölçümünde çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır. Bunlardan ilki 1897 yılında Wright ve Smith' in keşfettiği standart tüp aglutinasyonu testi (STA) dir. Bu testde aglutine olan antikorların hepsi ölçülmekte ancak bu antikorların ayırımı yapılamamaktadır. Reddin ve arkadaşları 2-merkaptotanol ekleyerek bu antikorları ayırtmışlar ve aktif infeksiyonla bağlantısının varlığını göstermişlerdir. Bu test ile Ig M yapısındaki antikorların aglutinasyonları inaktive edilmektedir. STA ve 2-merkaptotanol kombinasyonu testi brusellozun gidişatı ve tedaviye yanıtta kullanılmakta olan bir metottur (12,17, 18).

2.1.4. Klinik:

Bruselloz Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu ve Latin Amerika ülkelerinde endemik seyirlidir. Brucella cinsindeki bakteriler konak savunma mekanizmalarından kaçmaya eğilimli intraselluler mikroorganizmalardır. Hastalık vücutta çeşitli organları etkileyebilen sistemik bir infeksiyona yol açar. Başlıca semptomlar ateş, baş ağrısı, kas ağrısı, bel ağrısı, öksürük, terleme, eklem ağrısı, halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, kilo kaybıdır. Görüldüğü üzere klinik belirtilerinin geniş spektrumlu olmasından dolayı başka infeksiyöz (salmonella, tularemi, sifiliz, tüberküloz, viral hastalıklar) ve infeksiyöz olmayan hastalıklara benzer. Bundan dolayı hastalığın tanısı

sıklıkla gecikir veya yanlış teşhis konulur (2,19,20). Belirtiler inokülasyondan 2-4 hafta sonra başlar. Tedavi almamış hastalarda ondülan ateş paterni görülebilir. Vakaların % 80-90' ında ateş, % 10-20' sinde lenfadenopati, % 20-30' unda splenomegali ve hepatomegali görülebilir (21). Semptomların süresi ve şiddetine göre akut, subakut, kronik olmak üzere 3 gruba ayrılabilir (22). Gotuzzo brusellozu, hastalık semptomlarının süresine göre; akut (8 haftadan kısa), subakut (8-52 hafta), kronik (52 haftadan uzun) olmak üzere sınıflandırmıştır. (Tablo 1). Subklinik brusellozda semptomlar olmadığı ya da klinik bulgular tam olarak ortaya çıkmadığı halde serolojik bulgular gözlenebilir. Bu durum özellikle mezbaha çalışanları, veteriner hekimler ve hayvancılıkla uğraşanlarda görülür. Mezbahane çalışanlarında % 50' den fazla, veterinerlerde % 33'ten fazla yüksek anti-Brucella antikor titrelerinin olup bu kişilerde fark edilen bir klinik enfeksiyonun olmadığını gösteren yayınlar vardır (23). Akut bruselloz ise hafiften çok ağır seyirli toksik tabloya kadar değişen bir profil gösterir. Eğer spesifik bir organ tutulumu söz konusu ise hastalık fokal olarak tanımlanabilir. Hastalığın seyri sırasında özellikle tedaviye devam etmeyen hastalarda rölapslar görülebilir. Çoğunlukla rölapslar tedaviyi kestikten 3-6 ay sonra görülür (24,25). Ancak başarılı bir tedavinin ardından 2 yıl sonra bile rölaps olabilir (23, 26, 27, 28) . Enfeksiyon 12 aydan uzun sürerse hastalığın kronik olduğu düşünülebilir (29). Kronik bruselloz genellikle kemik, eklem, karaciğer, dalak veya böbrekteki süpüratif enfeksiyonların yol açtığı bir tablodur (30, 31).

Tablo 1. Brusellozun formları

Bulgular	Akut form (Bakteriyemi, <8hafta)	Subakut form (< 52 hafta)	Kronik form (> 52 hafta)
Yaş	Genç erişkin, çocuk	Genç erişkin	Erişkin, >40yaş
Artralji	Sıklıkla ++	Sıklıkla +++	Sıklıkla +++
Ateş	% 95	% 50-70	Yok
Hepatomegali	% 66	% 50	Nadir
Splenomegali	% 50-70	< % 40	Nadir
Hematolojik....	Nadir	Sıklıkla	Nadir
Psikiyatrik rahatsızlık	Yok	Nadir	Sıklıkla depresyon
Okuler tutulum	Yok	% 1-2	% 5-10

2.1.5. Komplikasyonlar:

Gastrointestinal Tutulum :

Gastrointestinal sistem komplikasyonları brusellozlu hastaların % 70' inden fazlasında görülmektedir (32). İştahsızlık, karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal veya kabızlık görülebilir (33). Patolojik lezyonlar olarak Peyer plaklarında inflamasyon ve intestinal mukozada hiperemi gözlenir. *B. melitensis'* in neden olduğu kolit ve ileit vakaları bildirilmiştir (34, 35).

Hepatobiliyer Tutulum :

Karaciğer retikuloendotelial sistemin en büyük organı olmasından dolayı brusellozda daima etkilenen bir organdır. Bununla birlikte karaciğer fonksiyon testleri bir miktar yükselmiştir. *B. abortus'* un etken olduğu tabloda oluşan granülomlar sarkoidozdan ayırtedilemezler (11). *B. melitensis'* in

oluşturduğu patolojide ise nekrozu çevreleyen mononukleer hücre kümeleri görülür, viral hepatite benzer. Süpüratif abseler görülebilir.

Brusellozun dalak ile ilgili komplikasyonları arasında splenomegaliye ilaveten abse oluşumu ve splenik kalsifikasyonlar da vardır (20,36). Süpüratif komplikasyonlar yıllar sonra gelişebilir. Karaciğer ve dalak abselerindeki kalsiyum yoğunluklarının saptanması kronik hepatosplenik süpüratif brusellozu gösterir (37). Brucella nadiren akut kolesistit, pankreatit, spontan bakteriyel peritonit nedeni olabilir (38, 39).

Osteoartikuler Tutulum:

Osteoartikuler komplikasyonlar brusellozlu olguların % 20-85' inde görülmektedir (40). Bunlar içerisinde sakroileit en sık görülen komplikasyondur. Vücudun ağırlığını taşıyan eklemler (kalça, diz, ayak bileği) küçük eklemlere göre daha sık etkilenirler. Artrit tablosu daha çok akut hastalık sırasında ve çocuk hastalarda görülürken, spondilit, vertebral osteomyelit ve paravertebral abseler daha çok kronik enfeksiyonlularda ve yaşlılarda görülmektedir. Gotuzzo ve arkadaşlarının yaptıkları prospektif çalışmada eklem tutulumu olan brusellozlu hastalar incelendiğinde periferik artrit tablosunun çocuklar ve genç erişkinlerde görüldüğü ve özellikle relapslar esnasında ortaya çıktığı, 55 yaşın üstündeki hastalarda nadiren görüldüğü saptanmıştır. Hastaların çoğunda monoartikuler tutulum vardır ve genellikle alt ekstremit eklemleri etkilenmiştir. Hastaların % 25' inde poliartrit tablosu görülmüştür.

Gotuzzo ve arkadaşları yaptıkları araştırmalar sonucunda 2 patolojik kalıp belirlemişlerdir. İlki eklem sıvısından Brucella mikroorganizmasının izole edildiği ve tek taraflı eklem tutulumu olan infeksiyöz artrit tablosudur. İkinci form ise eklem sıvısından Brucellanın izole edilemediği, birden fazla eklem tutulumunun olduğu reaktif artrit tablosudur. Bu ikinci tipte en çok etkilenen eklemler ayak bilekleri, el bilekleri, dirsekler, dizlerdir. Eklem sıvısının analizi ile bu iki grubun ayırımı yapılamamaktadır; lökosit sayısı 300-10000 / mm³ ve protein düzeyi 3 gr / dl' nin üzerindedir. İnfeksiyöz artritlerde eklem sıvısının

laktat düzeyi azalmıştır. Biyopsi yapıldığında bu iki grup yine ayrıtıdilememektedir (41).

Spondilit tablosu yaşa bağlı olup vakaların % 3-15' inde görülür. Genellikle lomber bölgede tutulur bunu servikal ve torakal vertebralar izler (42). Spondilit vakalarının % 20 kadarında 2 veya daha fazla vertebra tutulumu vardır.

Kardiyovaskuler Tutulum :

Endokardit brusellozlu olguların % 2' sinden daha azında görülür. Ancak hastalığın endemik olduğu yörelerde bu oranın % 10' a kadar yükselebildiği bildirilmiştir (43,44). Bruselloz ile ilişkili ölümlerin başında gelir. Aort kapağı daha sık tutulum gösterir. Hem doğal hem de prostetik kapaklara bağlı Brucella endokarditi vakaları bildirilmiştir.

Toraks Tutulumu :

Bakterinin hematogen yolla veya solunumla direk olarak akciğerlere gelmesiyle pulmoner tutulum ortaya çıkar. Nadir görülen komplikasyonlarındanndır. Üstelik pulmoner komplikasyonlar nadiren ciddi seyirli olular ve genellikle komplike olmayan brusellozun tedavisinde uygulanan rejimlere oldukça iyi yanıt verirler. Yapılan çalışmalarda görülme sıklığı % 1- 5 arasında değişmektedir. Ancak Pappas ve arkadaşlarının 450 bruselloz tanısı alan hastalar üzerinde yaptıkları araştırmada respiratuvar tutulumu % 7 olarak saptamışlardır . Bu olguların % 32' si pnömoni ile uyumlu bulunmuştur (45). Literatürde respiratuvar tutulum ile ilgili olarak kronik ampiyem (46), plevral efüzyon (47), granülomlar ve soliter nodüller (48), interstisyel pnömoni (49), hiler ve paratrakeal lenfadenopati ve pnömotoraks (50) olguları bildirilmiştir.

Nörolojik Tutulum :

Her ne kadar brusellozlu hastalarda depresyon yaygın şikayetlerden olsa da santral sinir sistemine direk invazyon olguların % 3-5' inde görülmektedir (2,41). Menenjit en sık görülen santral sinir sistemi komplikasyonudur. Bunun dışında ensefalit, myelit, beyin absesi, epidural abse, demyelinizan sendromlar bildirilmiştir. Literatürde izole intrakranial hipertansiyon olarak ortaya çıkan nörobruselloz vakaları vardır (51). Shakir ve arkadaşları nörobrusellozu ortaya çıkış şekline göre 2 gruba ayırmışlardır. Birinci grupta meningoensefalit gibi akut bir olay vardır. İkinci ve kronik formunda ise periferik ve santral sinir sisteminin her ikisi de etkilenir. Kronik periferik form proksimal poliradikülonöropatiyi içerir. Kronik santral form ise santral sinir sisteminin diffüz tutulumunu kapsar (52) .

Santral sinir sisteminin tutulumu basilin direk etkisiyle, sitokinler ve endotoksinlerin periferik sinirleri, spinal kordu, menenksleri ve beyini etkilemesiyle olabilir. Brusellozun nörolojik bulguları vertebral tutuluma veya beyin absesine sekonder olarak ortaya çıkabilir. Nörolojik sistem bulguları hastalığın başlangıcında, seyri sırasında, konvalesan döneminde veya akut enfeksiyonun iyileşmesinden aylar sonra ortaya çıkabilir.

Hematolojik Tutulum :

Anemi, lökopeni, trombositopeni sıklıkla saptanan bulgulardır. Hemofagositoz sonucu gelişir ve B. melitensis enfeksiyonlarında daha fazla görülmektedir. Küçük ve zor tanınabilen non-kazeifiye granülomlar hastaların % 70'inin kemik iliğinde nonspesifik reaktif histiyositlerle birlikte bulunabilir. Nadiren hematolojik anormallikler, enfeksiyonun erken dönemlerinde bulunur ve enfeksiyon etiyolojisini maskeleyip primer hematolojik patojenlerle karışabilmektedir (12). Ciddi trombositopeni ile ortaya çıkıp idiopatik trombositopenik purpura tanısı alan ancak daha sonradan bunun geçirilmekte olan Brucella enfeksiyonuna bağlı olduğu anlaşılan vakalar bildirilmiştir (53,54). Trombositopeni steroid tedavisi veya splenektomi gerektirecek düzeyde olabilir. Gotuzzo ve arkadaşları 485 bruselloz vakasında 19 hastada (% 2,5) ciddi trombositopeni ($< 50.000 / \text{mm}^3$)

saptamışlardır (41). Bu 19 hastanın 2 si kaybedilmiş, 10' u 2 aydan kısa süreli kortikosteroid tedavisine yanıt vermiş, 7' si 2 aydan uzun süreli (4-6 ay) kortikosteroid tedavisi almıştır. Uzun süreli kortikosteroid tedavisi alan bu 7 hastanın 4' ünde tam remisyon gelişmiş, 3'ünde ise daha sonra splenektomi yapılarak remisyon sağlanabilmiştir (41). Çoğu infeksiyon hastalığında trombositopeni geçici bir durumdur ve infeksiyon kontrol altına alındığında ortadan kaybolur. Brusellozda ise ciddi trombositopenili hastaların çoğunda uygun antibiyotik ve kortikosteroid tedavisine rağmen trombositopeni devam edebilir.

Okuler Tutulum:

Uveit, optik nörit, papilödem, korneal tutulum vakaları bildirilmiştir. Brucella uveiti noninfeksiyöz bir yanıt sonucu meydana gelir. Reaktif artrit benzer şekilde dolaşan immunkomplekslerin uveal hasarın oluşmasında rollerinin olduğu düşünülmektedir. Topikal ve sistemik kortikosteroid tedavisine yanıt verir. Güngür ve arkadaşlarının 147 bruselloz tanısı alan hastalar üzerinde yaptıkları araştırmada 38 (%26) hastada okuler komplikasyon görülmüş, bunların 26' sında konjunktivit, 6' sında anterior uveit, 1' inde posterior uveit, 2' sinde dakriyoadenit, 3' ünde episklerit saptanmıştır (55).

Genitoüriner tutulum :

Renal tutulum brusellozun nadir görülen komplikasyonudur. Literatürde brusellozla ilişkili olarak interstisyel nefrit, pyelonefrit, mesangiokapiller glomerulonefrit, Ig A nefropatisi olguları bildirilmiştir (12,56,57). Hastalarda hipertansiyon, makroskopik hematüri, masif proteinüri görülebilir (58).

Epididimoorşit brusellozun fokal bir komplikasyonu olup % 2-20 sıklığında görülmektedir ve genitoüriner sistemde rastlanan en sık komplikasyonudur (59). Martinez ve arkadaşlarının 59 Brucella epididimoorşiti arasında yaptıkları araştırmada en sık rastlanan semptom ve bulgular skrotal ağrı ve kitle, ateş, terleme olarak saptamışlardır (60). Testis ve epididimler lenfosit ve plazma hücreleri ile infiltre durumdadır ve seminifer

tubuller atrofiye uğramıştır. Kadınlarda salpenjit, servisit, pelvik abseler, over absesi olguları nadiren bildirilmiştir (12,61). Ayrıca literatürde brusellozun seksuel yolla geçişinin olduğunu düşündüren vakalar vardır (61).

Hayvan plasentasının eritriol içermesinden dolayı Brucella bakterisinin bu dokuya yerleşmesi kolaylaşmakta ve tablo spontan abortusla sonuçlanabilmektedir. İnsanlarda da bu enfeksiyon abortusla sonuçlanabilmekte ancak diğer enfeksiyöz nedenlerle oluşan abortuslara nazaran daha sık olmasının nedeni bilinmemektedir. STA 1/160 ve üzerinde titreleri olan asemptomatik bayanlarda abortus riski STA düşük veya negatif olanlara göre artmıştır (41).

2.1.6. Tanı:

Rutin laboratuvar testleri genellikle spesifik olmadığından tanıda yardımcı değildir. Lökosit sayısı genellikle normal veya düşüktür. Eritrosit sedimentasyon hızı normal veya yükselmiş olabilir. Anemi, trombositopeni ve pansitopeni görülebilir. Serum transaminaz düzeyleri sıklıkla yükselmiş olarak bulunur (20).

2.1.6.1. Görüntüleme Yöntemleri:

Vertebral osteomyelit, sakroileit veya artritlen şüphelenilen olgularda ilgili bölge bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans ile görüntülenmelidir. Spondilit vakalarında direk grafide erken bulgu olarak disk aralığında daralma en erken ve en sık görülen bulgudur (41).

Tc 99m MDP (metilen difosfonat) kemik sintigrafisi bruselloza bağlı osteoartikuler komplikasyonların teşhisinde oldukça kullanışlıdır .

2.1.6.2. Bakteriyolojik yöntemler:

Tüm enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi brusellozda da etkene yönelik tanıda bakterinin izolasyonu ve serolojik testler en önemli yöntemlerdir. Fakat her zaman bunlarda yeterli olmayabilir. Örneğin hastadan alınan kan kültürlerinde her zaman izolasyon şansı olmayabilir. Hastanın antibiyotik kullanmış olması, kandaki bakteri sayısının düşük olması gibi faktörler etkenin izole edilmesine engel teşkil edebilirler. Gotuzzo ve arkadaşlarına göre antibiyotik kullanmış hastalarda kan kültürü ile Brucella'nın izolasyon şansı % 50 düzeylerindedir, kemik iliği kültürü ile % 90 düzeylerinde olmaktadır (1).

Brucella bakterisi yavaş çoğalan bir bakteridir. Bu nedenle zengin besiyerlerine alınan kan örnekleri en az 3 hafta süre ile bekletilmelidir. Otomatize kültür sistemleri ile % 90 ihtimalle 7 gün içinde Brucella izole edilebilmektedir (62). Ancak yine de Brucella yavaş üreyen bir mikroorganizma olduğu için inkübasyon süresinin uzatılması, subkültürlerin yapılması önerilmektedir. Otomatize kan kültür sistemleri ile kontaminasyon riski daha azdır (63,64). Bactec, BacT/Alert, Vital bu otomatize kan kültürü sistemlerindedir (8). Özkurt ve arkadaşları bruselloz düşündükleri 50 hastadan aldıkları kan ve kemik iliği kültürlerini Brucella broth ve BacT/Alert sistemleri ile işleme tabi tutup karşılaştırmışlardır. İlk metodda hastaların hepsinde etkeni üretmişlerdir. BacT/Alert yönteminde ise 7 günlük inkübasyon sonrası yapılan subkültürlerle birlikte hastaların % 50'inde etken saptanabilmiştir. Aynı çalışmada BacT/Alert sisteminde Brucella melitensis' i ortalama saptama zamanı 4,5 gün olarak bulunmuştur (65). Aynı sistemle çalışan Solomon ve arkadaşları ortalama saptama zamanını 48 saat (66), Casas ve arkadaşları 2-3 gün olarak saptamışlardır (67). Gedikoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise Bactec 9120 sistemi kullanılmış ve ortalama 4. günde etkenler izole edilmiştir (68). Bannatyne ve arkadaşları ise Bactec 9240 sistemi ile 97 izolatın % 92' sini 5 gün içinde izole etmişlerdir (69).

Brucella menenjitli olan vakaların yapılan BOS analizinde diğer kronik menenjitlere benzer şekilde lenfositik pleositoz, protein miktarının artmış ,

glukoz düzeyinin azalmış ya da normal düzeyde olduğu saptanır. Gram boyaması ile etken genellikle görülemez. BOS kültürlerinin % 25' inden daha azında brucella üretilebilir. Bununla birlikte BOS' da spesifik antikorların saptanmasıyla konulur (12).

2.1.6.3. Serolojik Tanı:

Brusellozun tanısı sıklıkla serolojik olarak konulur (20).

2.1.6.3.1. Standart Tüp Aglutinasyonu:

Hasta serumunun katlı seri dilüsyonları yapılır ve üzerine eşit miktarda standart Brucella antijeni ilave edilir. Antijen olarak B. abortus' un insanlar için avirulan olan S99 numaralı standart suşu kullanılır. Brucella bakterileri hızlı antijen yapısı değiştirdiklerinden deneyde antijen olarak standart, iyi aglutinasyon veren kökenlerin S kolonilerden üretilmiş, ısı ile öldürülmüş, fenollü bakteri suspansiyonları kullanılır. 1/160 ve üzerindeki titreler veya 4 kat titre artışı anlamlı kabul edilmektedir (7). Normal kimselerde ve özellikle veteriner, kasap, çoban, çiftçi gibi meslekleri olan kişilerin serumlarında 1/80 – 1/100 titresinde normal aglutininler bulunabilir. STA testi Francisella tularensis, Yersinia enterocolitica infeksiyonları ve Vibrio cholerae aşısı olanlarda, Salmonella O:30, Escherichia hermannii, Escherichia coli O:157, Stenotrophomonas maltophilia, V. cholerae O:1 ve Y. enterocolitica O:9 lipopolisakkaritleri ile veya lenfoma ve tüberküloz olgularında çapraz reaksiyon verebilir. Ancak bu hastalarda titre genellikle 1/160 ın altındadır, nadiren 1/320 olur (12). Bu yöntemle B. canis' e karşı oluşan antikorlar saptanamaz ancak insanlar için patojen olan en sık 3 brucella türüne karşı oluşan antikorlar saptanabilir (7).

Brusellozda enfeksiyonunun akut döneminde ilk olarak Ig M antikorları birinci haftadan sonra ortaya çıkarlar. Titreleleri giderek artar ve üçüncü ayda en yüksek düzeye erişirler, sonra azalarak kaybolurlar. Ancak bir çok olguda düşük düzeyde ve bazen yüksek düzeyde uzun süre kanda bulunabilirler.

Ig G antikorları ise hastalığın başlangıcından yaklaşık 3 hafta sonra belirginleşerek 6-8 haftada en yüksek düzeye çıkarlar. Kronik enfeksiyon süresince uzun süre anlamlı düzeyde serumda bulunurlar. Bruselloz tedavisinden sonra Ig G antikorlarının artması olgunun kronikleştiği ve tedavinin sürdürülmesi gerektiğini gösterir (1). Yalnız Ig G antikorlarının titresini ortaya çıkarabilmek için Ig M' in 2- merkaptoetanole duyarlılığından faydalanılır. Aglutinasyon testinde kullanılan sulandırıcı eriyiğe 0,05 M 2-merkaptoetanol konulduğunda hasta serumundaki Ig M antikorları etkisizleşeceğinden, alınan sonuç yalnız Ig G antikorlarına ait olacaktır. Bu testte 2-merkaptoetanol yerine rivanolde kullanılabilir. Bruselloz için yapılan aglutinasyonlarda prezon olayına yani aglutinasyonun antikor fazlalığına bağlı olarak engellenmesi olayına sık olarak rastlandığından yapılacak olan aglutinasyon deneylerinde sulandırımın oldukça ileri oranlarda yapılması gerekmektedir (70).

2.1.6.3.2. Coombs Serumu Testi:

Klinik olarak bruselloz belirtileri belirgin olduğu halde yapılan aglutinasyon testlerinin olumsuz olması brusellozda görülebilen bir durumdur. Olay, antikorların antijenlere bağlandıkları halde aglutinasyon reaksiyonu oluşturmamasını engelleyen mekanizmanın var olmasından doğmaktadır (70). Standart aglutinasyon deneyinde aglutinasyon vermeyen tüpler tuzlu su ile 3 kez yıkanarak yeniden süspansiyon yaptıktan sonra her tüpe 1 damla Coombs serumu (anti-human globulin) damlatıldığında blokan antikorların bulunması halinde aglutinasyon görülür (71).

2.1.6.3.3. Oponositofajik Test:

Hasta serumundaki fagositozu kolaylaştıran ve opsonin adı verilen antikorların ortaya çıkarılması için yapılan bir testtir. Tanı; hasta serumu lökosit ve bakteri süspansiyonunun birbirleri ile karıştırılmasından sonra 15 dakika, 37 °C' de inkübe edilmesi ve buradan hazırlanarak giemsa ile

boyanan preparatın incelenmesi ile konur. Bir lökosit tarafından fagosite edilen ortalama bakteri sayısı, fagositik endeksi verir. Bu sayı 6,10 veya daha fazla ise test pozitifdir (1).

2.1.6.3.4. Rose-Bengal:

Brucella abortus' un 99-S kökeninden hazırlanan ve özel teknikle Rose-Bengal boyası ile boyanan, tamponlu tuzlu sudaki yoğun *Brucella* antijeni kullanılarak yapılan bir deneydir. Cam bir plak üzerinde 0.003 ml. antijen üzerine aynı miktar serum damlatılıp elde çevrilerek 4 dakika içinde bakterilerin kümeleşerek aglutine olmaları olumlu sonuç sayılır (71).

2.1.6.3.5. EIA:

Hastalığa spesifik Ig A, Ig M, Ig G antikorları bakılabilmektedir. Başlangıçta testin standardizasyonu ile ilgili sorunlar yaşanmış, daha sonra rutin kullanıma girmiştir.

EIA ile STA testinin yapılan karşılaştırılmalı çalışmalarında nörobruselloz olgularında EIA' nın daha üstün olduğu vurgulanmaktadır (72). Ancak STA testine göre pahalı bir yöntem olması ve her yerde bulunmaması dezavantajdır (12). Ayrıca ELISA yöntemi SAT' na göre laboratuvarın laboratuvara daha az standardize edilmiştir (7).

2.1.6.3.6. PCR:

PCR' in keşfi mikroorganizmaların birkaç saat içinde tanımlanabilmesi nedeni ile identifikasyonda yeni bir boyut meydana çıkarmıştır. PCR geleneksel tanımlama metodlarına göre daha hızlı ve daha duyarlı bir yöntemdir. Bununla birlikte sensitivite ve spesivitesi laboratuvarın laboratuvara değişmekte ve standardizasyonunda sorunlar vardır (73).

2.1.7. Tedavi:

Brucellanın hücre içinde yaşayan bir bakteri olmasından dolayı tedavi seçenekleri sınırlıdır. Hastalığın efektif bir şekilde tedavisi için antibiyotiğin hücre içi ortamda yüksek konsantrasyonda bulunması ve tedavinin süresinin uzun olması gerekmektedir (5). Tedavi rejiminin seçimi ve antimikrobiyal tedavinin süresi fokal hastalığın varlığına ve hastanın yaş, gebelik, allerji, renal yetmezlik gibi şartlarına bağlı olarak seçilmelidir (12). Tek başına antibiyotik kullanımı rölaps ve başarısızlıkla sonuçlanır. Geniş kapsamlı yapılan bir derlemede 1949-1988 yıllarında bin hasta, bu ilaçların tek başına kullanımında %7-32 rölaps göstermiştir (74,75).

Tetrasiklinler: Bakterilerin 30 S ribozomları ile birleşerek protein sentezini inhibe ederler. Etkileri bakteriyostatik olup geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Doksisisiklinin yarılanma ömrü 16-18 saat olup uzun etkilidir. Lipofilik özellik gösterdiğinden dolayı dokulara iyi penetre olurlar. Tetrasiklinler plasentayı geçer , fetal diş ve kemiklerde renk değişikliklerine ilaveten gelişme bozukluğu ve kemik deformiteleri yapabilir. Bebek ve 8 yaşın altındaki çocuklarda dişlerde gelişme bozukluğuna yol açarlar (76).

Rifampisin: Bakterisid etkili bir antibiyotiktir. DNA' ya bağımlı RNA polimerazı inhibe ederek etkisini gösterir. Tüm vücut dokularına iyi dağılır. Menenjitli hastalarda BOS' a terapötik dozlarda geçer (76). Bruselloz geçiren gebelerin tedavisinde kullanılabilir (12).

Hücre içine iyi penetre olabilen antibiyotiktir. 1059 bruselloz hastasının incelendiği bir meta analizde doksisisiklin ve rifampisin tedavisi alanlarda % 17, doksisisiklin ve streptomisin tedavisi alanlarda ise % 5 oranında rölaps görülmüştür (20,77).

Aminoglikozidler: Protein sentezini inhibe ederek etkilerini gösterirler. Etkileri bakterisidaldir. Spondilitli hastalarda doksisisiklin + streptomisin kombinasyonunun doksisisiklin + rifampisin kombinasyonuna göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (78).

Dünya Sağlık Örgütü' nün önerisine göre bruselloz tedavisinde doksisisiklin 200 mg/gün ve rifampisin 600-900 mg/ gün 6 hafta süresince

uygulanmalıdır. Alternatif olarak Streptomisin 1 gr/gün intramuskuler olarak 21 gün + doksisisiklin 200 mg/ gün 6 hafta süre ile kullanılabilir.

8 yaşından küçük çocuklarda rifampisin ile kotrimoksazol (45 gün) veya buna alternatif olarak gentamisin ilk 5 gün 5 mg/kg/gün dozunda rifampisinle (45 gün) kombine bir şekilde kullanılabilir. Bu tedavide rölaps yok denecek kadar azdır (12).

Kinolonlar: Etkilerini DNA girazı inhibe ederek gösterirler. Etkileri bakterisidaldir. Kinolonların ve de özellikle de ofloksasinin Brucellaya karşı in vitro etkinliği mükemmel olup makrofaj ve lökositlerin içine rahatlıkla geçebilirler (79). Ağalar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada siprofloksasin 1 gr/gün + rifampisin 600 mg/gün ile doksisisiklin 200 mg/gün + rifampisin 600 mg/ gün tedavi rejimleri karşılaştırılmış, ilk gruba 30 gün, 2. gruba ise 45 gün tedavi verilmiştir. Tedavilerin etkinlikleri ve rölaps oranları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (4).

Kotrimoksazol: Bakterisid etkiye sahiptir. İlk başta monoterapi şeklinde uygulanmış ancak yüksek rölaps nedeniyle terk edilmiştir. 8 yaşından küçük çocuklarda tetrasiklinler kullanılamayacağından dolayı rifampisin ile kombine şekilde kullanılabilir (13).

Hepatik, splenik, paraspinal yerleşimli brusellar abselerin tedavisinde medikal tedaviye ilaveten absenin cerrahi drenajı da sağlanmalıdır (12).

Endokardit olgularında cerrahi ve medikal tedavinin birlikte uygulanması mortaliteyi belirgin olarak azaltmaktadır. Tercih edilen kombine tedavi rejimi doksisisiklin + gentamisin + rifampisin ± kotrimoksazoldur. Replasman sonrası antimikrobiyal tedavinin ne kadar süre ile verileceği tartışmalıdır ancak 3 aydan kısa süreli tedavi önerilmemektedir (12).

Nörobrusellozlu olgularda doksisisiklin + rifampisin ya da doksisisiklin + kotrimoksazol tercih edilir. Bu tedaviye BOS' a iyi geçtiği bilinen seftriaksonda ilave edilebilir (13).

3. MATERYAL

Bu çalışmada aşağıdaki malzemeler kullanılmıştır

- Bactec 9120 kan kültür cihazı (Becton Dickinson)
- Bactec pediatric kan kültür şişeleri (Becton Dickinson)
- Brucella melitensis antiserumu (Oxoid)
- U tabanlı 96 kuyucuklu steril mikropalaklar
- Brucella Broth (acumedia)
- Brain-Heart Infusion Broth (Oxoid)
- Brucella agar (Oxoid)
- % 3' lük H₂O₂ (Oxoid)
- Oksidaz miyarı (Oxoid)
- Üre (Oxoid)
- Platin öze
- Brucella supplement (Oxoid)
- Tiyonin (Difco)
- Bazik fuksin (Difco)
- Etüv (Nüve EN 500)
- Pasteur fırını (Memmert)
- 13x100 mm lik tüpler, balonlar
- McFarland ölçüm cihazı (Becton Dickinson)
- Petri kapları
- Escherichia coli ATCC 25922
- Otomatik pipet 20 – 200 µl (Genex Beta)
- Otomatik pipet 1-20 µl (Eppendorf research)
- Steril pipet uçları
- Derin dondurucu (Sanyo)
- Hassas terazi d=0.1 mg hassaslığında (Scaltec)
- Vorteks (Nüve NM 110)

- Antibiyotik bazları
 - Tetrasiklin (Sigma)
 - Streptomisin (Sigma)
 - Rifampisin (Sigma)
 - Doksisiklin (Fako)
 - Levofloksasin (Aventis)
 - Seftriakson (Sigma)
 - Amoksisiklin (Sigma)
 - Siprofloksasin (Bayer)
- Steril distile su
- Metanol
- Fosfat tamponu pH 6.0 0.1 mol/l
- NaOH pH 6.0 0.1 mol/l

Bu çalışmada 1999-2005 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları servisinde takip edilen hastaların alınan kan kültürlerinden izole edilen 34 Brucella suşu incelendi.

Bakteri suşları % 20 gliserol içeren Brain-Heart Infusion Broth' ta – 80 °C' de saklandı. Stoklanan izolatlar çalışma günlerinde çözülerek iki kez arka arkaya Brucella agarda subkültürleri yapıldı.

Kontrol suşu olarak NCCLS' in önerileri doğrultusunda ve Escherichia coli ATCC 25922 standart suşu kullanılmıştır.

4. METOD

4.1. İzolasyon yöntemi:

Hastalardan ateşli oldukları dönemde alınan kan kültür şişeleri Bactec 9120 otomatik sisteminde inkübasyona bırakıldı. Pozitif sinyal veren şişelerden Brucella agar (suplement içeren) ve EMB besiyerlerine ekimleri yapıldı ve % 5 CO₂' li ortamda inkübasyona bırakıldı. 5 günlük inkübasyon sonucunda 2 mm çapında küçük, yuvarlak, saydam, düzgün kenarlı, hemolizsiz, pigmentsiz, şebnem tanesine benzeyen kolonilerden Gram boyama yapıldı. Mikroorganizmaların Gram (-) kokobasil oldukları görüldü. Temiz bir lam üzerine % 3' lük hidrojen peroksit damlatıldı. Platin özenin ucu ateşte yakılarak sterillendi ve soğuması için havada sallayarak bir süre bekletildi. Şüpheli kolonilerden alınıp hidrojen peroksit içine sokuldu ve gaz kabarcıklarının çıkmasıyla testin pozitif olduğu anlaşıldı. Test 34 suşun her birisinde 2 kez tekrarlandı ve hepsinde pozitif olarak değerlendirildi. Bunun ardından taze hazırlanmış oksidaz miyarı ile kurutma kağıdı ıslatıldı. Şüpheli kolonilerden platin öze vasıtasıyla alınan örnek ıslak kurutma kağıdına sürüldü. 10 saniye içinde kolonilerin sürüldüğü bölgenin mor renge boyandıkları görüldü ve oksidaz pozitif olarak değerlendirildi. Yine bu test 34 suşun her birinde 2 kez tekrarlandı ve hepsinin pozitif oldukları görüldü . Ardından Crytensen üre agar besiyerinin yüzeyine saf kolonilerden çizgi ekimleri yapılarak üreaz aktiviteleri araştırıldı. 34 şüpheli suşun ekimden 2-4 saat arasında değişen zamanlarda besiyerinin rengini pembeye dönüştürdükleri görüldü ve hepsinin üreaz aktivitelerinin oldukları görüldü. Boya inhibisyon deneyi için içinde 200 ml Brucella agar bulunan 5 balon alındı. Saf suda hazırlanmış olan % 0.1' lik thionin eriyiğinden 2 ml 1. balona, 4 ml ikinci balona, 8 ml 3. balona konuldu ve böylece tiyoninin 1/100000, 1/50000, 1/25000 oranlarında derişimleri elde edildi. Hazırlanan bu karışımlar plaklara döküldü. Diğer taraftan aynı şekilde % 0.1' lik bazik fuksin eriyiğinden 4. balona 2 ml, 5. balona 4 ml konularak 1/100000 ve 1/50000 oranlarında derişimleri elde edildi, plaklara döküldü. Dökülen plaklara Brucella bakterilerinden çizgi ekimleri yapıldı ve birisi CO₂ ' li ortamda diğeri

normal etüvde olmak üzere 37 °C' de tekrar inkübasyonları yapıldı. 48 saat sonra üremeleri kontrol edildi. Tüm suşların her iki ortamda da (CO₂ ' li ve CO₂ siz) tisoninin 1/100000 oranındaki konsantrasyonunda ve fuksinin 1/50000 ve 1/100000 konsantrasyonunda üremelerinin oldukları görüldü. Kolonilerin temiz bir lam üzerinde iki ayrı yerde serum fizyolojik içinde süspansiyonları yapıldı. Birine bir damla Brucella melitensis antiserumu, diğerine serum fizyolojik eklendi. Serum ve süspansiyonlar karıştırıldı. Brucella melitensis antiserumu ile aglutinasyon veren suşlar Brucella melitensis olarak tanımlandı.

4.2 Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması:

Üretici firmalardan temin edilen antibiyotik tozları

Ağırlık (mg) = Hacim (ml) x Konsantrasyon (µg/ml) / Antibiyotik potensi (µg/ml) formülü kullanılarak NCCLS tarafından önerilmiş olan (80) tablo 2' de belirtilen çözücü ve sulandırıcılarla hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonlar duyarlılık testinin yapılacağı güne kadar < -20 °C' de saklandı.

Tablo 2. Kullanılan antibiyotiklerin çözücü ve sulandırıcıları

Antibiyotik	Çözücü	Sulandırıcı
Amoksisilin	Fosfat tamponu pH 6.0 0.1 mol/l	Fosfat tamponu pH 6.0 0.1 mol/l
Levofloksasin	½ hacim suya, 0.1 mol/l NaOH eriyene kadar damlatılır	Su
Rifampin	Metanol	Su (karıştırılarak)
Tetrasiklin	Su	
Streptomisin	Su	
Seftriakson	Su	
Doksisiklin	Su	
Siprofloksasin	Su	

4.3. İnokulumun Hazırlanması:

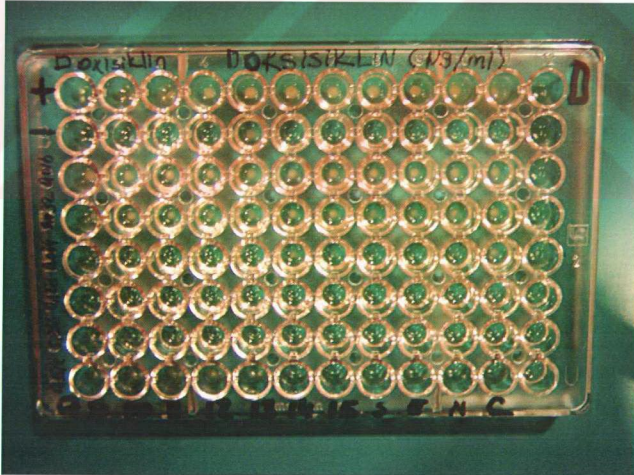
Daha önceden pasteur fırınında sterillenen cam tüpler içerisine serum fizyolojik eklendi. İnokulum agar plağındaki tek düşmüş kolonilerden doğrudan serum fizyolojik içinde süspansiyon yapıldı ve 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. 0.5 McFarland standardına göre ayarlanan bakteri süspansiyonu (10^8 CFU/ml), 1/10 oranında sulandırıldı (81).

4.4. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi:

Duyarlılık testi 100 µl alan U tabanlı steril mikropaklar kullanılarak yapıldı. Tüm çukurlara 100 µl Brucella Broth dağıtıldı. İlk çukurlara hazırlanan antibiyotik stok solüsyonundan 100 µl konuldu ve seri sulandırım yapıldı. Her çukurda 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonundan tüm çukurlara 5 µl dağıtıldı. Her plağa antibiyotik içermeyen üreme kontrolü (bakteri + besiyeri) konuldu (81). Mikropakların üstleri kapatılarak 37 °C etüve yerleştirildi.

5. BULGULAR

37 °C' de 24 saatin sonunda kontrol suşu olarak kullanılan ve *Escherichia coli*' nin olduğu kuyucuklar hariç diğer tüm kuyucuklarda üremenin olmadığı görüldü. 48 saatlik inkübasyon sonucunda bakteri suşlarının buldukları seri dilüsyonun yapıldığı kuyucuklarda üremelerin olduğu saptandı. Pozitif kontrol kuyucuklarının hepsinde üremelerin olduğu görüldü. Negatif kontrol kucuklarının da hiç birisinde üreme görülmedi. MİK değerleri çıplak gözle okunarak belirlendi ve buna göre üremenin gözlenmediği en düşük antimikrobik konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi. Arada üreme olmamış bir kuyucuğun görüldüğü durumda en yüksek MİK okundu. Arada birden fazla üreme olmayan kuyucuk görülmedi. MİK değerleri belirlendikten sonra MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri bulundu. Değerlendirilmeler yapıldıktan sonra yeniden etüve konulan mikroplaklarda inkübasyonun 72. saatinde yapılan değerlendirmede sonuçlarda bir değişiklik olmadığı görüldü.



Şekil 1: 15 numaralı suşun doksiziklin MİK düzeyi 0,64 µg/ml' dir.

Tetrasiklinin MİK aralığı 0.08-0.64 µg/ml arasında, MİK₅₀ değeri 0.16 µg/ml, MİK₉₀ değeri 0.32 µg/ml olarak saptandı.

Doksisiklinin MİK aralığı 0.16-0.64 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0.32 µg/ml, MİK₉₀ değeri 0.64µg/ml olarak bulundu.

Streptomisinin MİK aralığı 1-8 µg/ml, MİK₅₀ değeri 4 µg/ml, MİK₉₀ değeri 8 µg/ml olarak belirlendi.

Amoksisilinin MİK aralığı 0.5-4 µg/ml, MİK₅₀ değeri 1 µg/ml, MİK₉₀ değeri 2 µg/ml olarak saptandı.

Rifampisinin MİK aralığı 0.5-4 µg/ml, MİK₅₀ değeri 1 µg/ml, MİK₉₀ değeri 2 µg/ml olarak bulundu.

Seftriaksonun MİK aralığı 0.125-2 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0.5 µg/ml, MİK₉₀ değeri 1 µg/ml olarak belirlendi.

Levofloksasinin MİK aralığı 0.25-1 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0.5 µg/ml, MİK₉₀ değeri 0.5 µg/ml olarak belirlendi.

Siprofloksasinin MİK aralığı 0.25-1 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0.5 µg/ml, MİK₉₀ değeri 1 µg/ml olarak belirlendi.

Tablo 3: Antibiyotiklerin MİK aralıkları ve MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

Antibiyotikler	Aralık	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Tetrasiklin	0.08-0.64	0.16	0.32
Doksisiklin	0.16-0.64	0.32	0.64
Streptomisin	1-8	4	8
Amoksisilin	0.5-4	1	2
Rifampisin	0.5-4	1	2
Seftriakson	0.125-2	0.5	1
Levofloksasin	0.25-1	0.5	0.5
Siprofloksasin	0.25-1	0.5	1

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bruselloz bir zoonozdur. İnsanlara hayvanlardan veya hayvan ürünlerinden bulaşmaktadır. En sık olarak hayvanlardan elde edilen pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri ile bulaşmaktadır. Hastalık tüm dünyada, özellikle Akdeniz bölgesi ve gelişmekte olan ülkelerde önemini koruyan bir sorun olarak devam etmektedir. Ülkemizde endemik bir seyir göstermektedir. B. abortus hayvancılığın fazla olduğu Doğu Anadolu' da ve diğer bölgelerdeki şehir merkezine yakın yerleşimlerde görülürken, B. melitensis Akdeniz ve İç Anadolu kırsalında daha yoğun olarak görülmektedir. Ayrıca B. melitensis' in patojenitesi daha fazladır ve mide pH'ında inaktivasyona karşı daha dirençlidir. İzole ettiğimiz suşların tümünün B. melitensis olması bunlara bağlı olabileceği gibi yöremizde keçiciliğin çok yaygın olmasına da bağlı olabilir.

Erişkinde brusellozun WHO önerilerine göre klasik tedavisi doksisisiklin + streptomisin veya doksisisiklin + rifampisin kombinasyonu şeklindedir. Ancak bu ilaçların yan etkileri ve tedaviden sonra ortaya çıkan rölapslar nedeni ile yeni tedavi protokolü arayışlarına girilmiştir. Mikroorganizma hücre içi patojendir ve fagolizozom gibi asidik ortamlara karşı dirençlidir. Tedavinin etkili olabilmesi için uygulanacak olan antibiyotığın hücre içine yüksek konsantrasyonda girebilmesi gereklidir.

İnsan brusellozunda farklı kemoterapi rejimlerinin etkinliklerini saptamak için birçok çalışma yapılmıştır. İn vitro olarak Brucella bakterilerine karşı tetrasiklinler, aminoglikozidler, aminopenisilinler, bazı sefalosporinler, bazı kinolonlar etkili bulunmuştur.

Bosch ve arkadaşlarının 95 B. melitensis suşu ile yaptıkları çalışmada rifampisine karşı suşların % 98'inin 2.0 µg/ml' de inhibe olduğu görülmüş ve MİK aralığı 0.12-4.0 µg/ml olarak saptanmıştır (82). Martin ve arkadaşlarının 105 B. melitensis suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında rifampisine karşı suşların MİK₁₀₀ değerini 1 mg/l olarak saptamışlardır (83).

Yine Martin ve arkadaşlarının 160 *B. melitensis* suşunda yaptıkları çalışmada rifampisin için MİK aralığı 0.5-1.0 µg/ml ve MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini 1 µg/ml olarak saptamışlardır (84). Akova ve arkadaşlarının 1993 yılında 49 *B. melitensis* suşunda yaptıkları duyarlılık çalışmasında rifampisinin MİK aralığı 0.03-1.0 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0.5 µg/ml (5), 1995 yılında 42 *B. melitensis* suşunda yaptıkları çalışmada ise MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 2.0 µg/ml ve 8.0 µg/ml olarak bulunmuştur (85). Yine Akova ve arkadaşları yaptıkları bir diğer araştırmada 43 *B. melitensis* izolatında rifampisinin MİK₅₀ değerlerini pH 7.0' da 2 µg/dl, pH 5.0' da 0.25 µg/dl ve MİK₉₀ değerlerini ise pH 7.0' da 2 µg/dl, pH 5.0' da 1 µg/dl olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada rifampisin + ofloksasin kombinasyonun pH 7.0' da suşların % 85' ine karşı antagonistik etki gösterdiği görülmüştür. Ancak rifampisin + ofloksasin kombinasyonu ile tedavi edilen bruselloz vakaları vardır. Yine rifampisin + doksisisiklin kombinasyonunun pH 7.0' da suşların % 85' ine karşı sinerjistik etki gösterdikleri saptanmıştır. pH 5.0' da ise bu sinerjistik etkinin benzer oranda (%85) olduğu saptanmıştır (86). Rubinstein ve arkadaşlarının 86 *B. melitensis* suşları ile broth mikrodilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada rifampisin için MİK₅₀ değerini 2.5 µg/dl, MİK₁₀₀ değerini ise 4.0 µg/dl olarak bulmuşlardır (87). Qadri ve arkadaşlarının 105 *B. melitensis* suşunda broth dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin için MİK₅₀ değerini 0.25 µg/dl, MİK₉₀ değerini ise 1.0 µg/dl olarak saptamışlardır (88). Garcia ve arkadaşlarının agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada 62 *Brucella* spp. suşu incelenmiş ve rifampisin için MİK₅₀ değeri 0.5 µg/dl, MİK₉₀ değeri ise 1 µg/dl olarak saptanmıştır (89). Bodur ve arkadaşlarının E test yöntemi ile 41 *Brucella* suşunda yaptıkları çalışmada rifampisin için MİK₅₀ değeri 0.50 µg/dl, MİK₉₀ değeri ise 0.75 µg/dl olarak saptanmıştır (90). Ariza ve arkadaşları 81 *B. melitensis* suşuna rifampisin duyarlılığını çalışmışlar MİK aralığını 0.5-2.0 µg/ml, MİK₉₀ değerini 1 µg/ml bulmuşlardır (78). Baykam ve arkadaşlarının 42 *Brucella* suşu ile E test metodu ile yaptıkları duyarlılık çalışmasında rifampisin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.75 mg/l ve 1.0 mg/l olarak saptanmıştır (91).

Bu çalışmada rifampisin $MİK_{90}$ değeri 2 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmış olup bahsedilen çalışmalarla benzer bir sonuç elde edilmiştir.

Bu çalışmalardan anlaşılacağı gibi rifampisin, *Brucella* spp. grubu bakterilere karşı *in vitro* etkinliği iyi olan bir antibiyotiktir.

Bosch ve arkadaşlarının 95 *B. melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada suşların tamamının doksisisiklinin 0.25 $\mu\text{g/ml}$ düzeyinde inhibe olduğu saptanmış ve doksisisiklin ile tetrasiklinin en aktif antibiyotikler oldukları bildirilmiştir (82). Ariza ve arkadaşlarının 81 *B. melitensis* suşu ile yaptıkları duyarlılık çalışmasında $MİK$ aralığı 0.06-0.25 $\mu\text{g/ml}$ ve $MİK_{90}$ değeri 0.25 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (78). Baykam ve arkadaşlarının 42 *Brucella* suşu ile E test metodu ile yaptıkları duyarlılık çalışmasında doksisisiklin için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 0.032 mg/l ve 0.064 mg/l olarak bulunmuştur (91). Bodur ve arkadaşlarının E test yöntemi ile 41 *Brucella* suşunda yaptıkları çalışmada doksisisiklin için $MİK_{50}$ değeri 0.047 $\mu\text{g/ml}$ ve $MİK_{90}$ değeri 0.064 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur (90). Garcia ve arkadaşlarının agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada 62 *Brucella* spp. suşunda tetrasiklin için $MİK_{50}$ değeri 0.2 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (89). Qadri ve arkadaşlarının 105 *B. melitensis* suşunda broth dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada tetrasiklinin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerlerini sırasıyla 0.25 mg/l ve 0.5 mg/l olarak saptamışlardır (88). Martin ve arkadaşlarının 105 *B. melitensis* suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında doksisisiklin için $MİK$ aralığı 0.12-0.25 $\mu\text{g/ml}$ ve $MİK_{100}$ değeri 0.25 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (83). Yine Martin ve arkadaşlarının 160 *B. melitensis* suşunda yaptıkları çalışmada doksisisiklin için $MİK$ aralığı 0.12-0.25 $\mu\text{g/ml}$ ve $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri 0.25 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (84). Akova ve arkadaşlarının 42 *Brucella melitensis* suşuna karşı yaptıkları doksisisiklin çalışmasında pH 7' de $MIC_{50} < 0.125$ ve $MİK_{90}$ 0.25 $\mu\text{g/ml}$ (85), 49 suş üzerinde yaptıkları bir başka çalışmada ise doksisisiklin için $MİK$ aralığı 0.03-0.5 $\mu\text{g/ml}$ ve $MİK_{90}$ değeri 0.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (5). Yine Akova ve arkadaşları yaptıkları bir diğer araştırmada 43 *Brucella melitensis* izolatında doksisisiklin için $MİK_{50}$ değerlerini pH 7.0' da < 0.125 $\mu\text{g/ml}$ ve pH 5.0' da 1 $\mu\text{g/ml}$, $MİK_{90}$ değerlerini ise pH 7.0' da < 0.125 $\mu\text{g/ml}$ ve pH 5.0' da

2 µg/ml olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada antimikrobiyal kombinasyonların etkileşimlerine bakılmış pH 7.0' da doksisisiklin + streptomisin kombinasyonunun suşların % 90' ına karşı sinerjistik etkinlik gösterdikleri görülmüştür. Ancak bu etkileşimin pH 5.0' da önemli oranda azaldığı (suşların % 35 'inde) saptanmıştır (86).

Bu çalışmada tetrasiklin ve doksisisiklinin $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 0,32 µg/ml, 0,64 µg/ml olarak bulunmuştur. Tüm bunların ışığında tetrasiklin ve doksisisiklinin *Brucella spp.*' e karşı in vitro etkinlikleri oldukça iyi olan antibiyotikler oldukları söylenebilir.

Garcia ve arkadaşlarının 62 *Brucella spp.* suşunda agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada streptomisin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 2 µg/ml ve 4 µg/ml olarak bulunmuştur (89). Martin ve arkadaşlarının agar dilüsyon tekniği ile yaptıkları bir diğer çalışmada ise streptomisin için $MİK_{100}$ değeri 16 mg/l olarak saptanmıştır (83). Yine Martin ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada 160 *Brucella melitensis* suşunda çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık araştırılmış ve streptomisin için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri 8 µg/ml olarak saptanmıştır (84). Rubinstein ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada broth mikrodilüsyon metodu ile duyarlılık araştırılmış ve streptomisin için $MİK_{50}$ değeri 1.25 µg/ml, $MİK_{90}$ değeri 3.1 µg/ml olarak saptanmıştır (87). Akova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada streptomisin için pH 7.0' da $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 1 µg/ml ve 2 µg/ml, pH 5.0' da $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 16 µg/ml ve 128 µg/ml olarak saptanmıştır (86).

Yapılan diğer çalışmalarla benzer bir şekilde bu çalışmada streptomisin için $MİK_{90}$ değeri 8 µg/ml gibi diğer antibiyotiklere göre daha yüksek bir değer olarak saptanmıştır.

Kinolon grubu antibiyotiklerden biri olan siprofloksasinin Bodur ve arkadaşlarının E test metodu ile yaptıkları çalışmada $MİK_{50}$ değeri 0.125 µg/ml ve $MİK_{90}$ değeri 0.25 µg/ml gibi düşük bir değer olarak saptanmıştır (90). İsrail' den Rubinstein ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptıkları çalışmada siprofloksasinin $MİK_{50}$ değeri 0.4 µg/ml, $MİK_{90}$ değeri 0.8 µg/ml olarak saptanmıştır (87). Ankara' dan Kocagöz ve arkadaşlarının 69 *Brucella*

melitensis izolatu ile kinolon grubu antibiyotiklere karşı agar dilüsyon metoduyla yaptıkları duyarlılık çalışmasında siprofloksasinin MİK aralığı 0.06 - 2 µg/ml ve MİK₅₀ değeri 0.25 µg/ml, MİK₉₀ değeri 0.50 µg/ml olarak saptanmış ve ortamın pH' sı ile kinolonların aktivitelerinin ilişkili olduğu, pH 5.0 ' da aktivitelerinin azaldıkları, >7.0 ' nın üstünde arttıkları belirtilmiştir (92). Bu nedenle fagolizozomlardaki asidik pH ortamında aktivitelerinin azaldıkları belirtilmektedir. Akova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada için pH 7.0 ' da siprofloksasin için MİK aralığı < 0.125-8 µg/ml MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 0.5 ve 2 µg/ml olarak saptanmış; pH 5.0' da MİK aralığı 2->16 µg/ml MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 16 ve >16 µg/ml olarak bulunmuştur. İn vitro koşullarda asidik pH ortamında siprofloksasinle birlikte streptomisin, ofloksasin, eritromisin ve azitromisin etkinliklerinin azaldıkları gözlenmiştir (86). Yine Ankara' dan Baykam ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada siprofloksasin için MİK aralığı 0.064-0.50 mg/l ve MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.094 ve 0.19 mg/l olarak saptanmıştır. Bu çalışmada 42 Brucella izolatu incelenmiş ve bunların 37 ' si Brucella melitensis ve 5 tanesi de Brucella abortus olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre NCCLS 'in yavaş üreyen mikroorganizmalara göre duyarlılık tablosuna göre suşların hepsi siprofloksasine duyarlı olarak bulunmuştur (91). Qadri ve arkadaşlarının 105 Brucella melitensis suşu ile broth dilüsyon metoduyla yaptıkları çalışmada siprofloksasin MİK aralığı 0.06 - > 4.0 mg/l MİK₅₀ değeri 0.25 mg/l, MİK₉₀ değeri ise 0.5 mg/l olarak bulunmuştur (88). Martin ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada siprofloksasinin MİK aralığı 0.25-1 µg/ml olarak saptanmış, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 1 µg/ml olarak bulunmuştur (84).

Bu çalışmada siprofloksasinin MİK aralığı 0.25-1 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.5 ve 1 µg/ml olarak saptanmıştır. Tüm bu çalışmalara göre Brucella spp. grubu bakterilere karşı siprofloksasinin in vitro etkinliğinin oldukça iyi olduğu ve tedavi rejimlerinde kullanılabileceği söylenebilir. Bununla birlikte kronik osteomyelit olgularında doksisisiklin ve rifampisine ilaveten siprofloksasin kullanımı ile tedavide oldukça iyi yanıt alınmış vakalar vardır (93).

Kocagöz ve arkadaşlarının 69 *Brucella melitensis* suşunda agar dilüsyon tekniği ile yaptıkları duyarlılık çalışmasında levofloksasin için $MİK_{50}$ değeri 0.12 mg/l ve $MİK_{90}$ değeri 0.50 mg/l olarak saptanmıştır (92). Martin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada levofloksasin için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri 0.5 µg/ml olarak saptanmıştır (84).

Bu çalışmada levofloksasinin $MİK_{90}$ değeri 0.5 µg/ml olarak saptanmıştır. 34 Suşa karşı siprofloksasin ve levofloksasin $MİK$ düzeylerinin birbirlerine yakın değerler olması nedeniyle in vitro etkinliklerinin eşit düzeyde oldukları söylenebilir. Kinolonlar *Brucella* spp. grubu bakterilere karşı in vitro etkinliği iyi olan ve de hücre içi ortamda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilen bir antibiyotik grubu olduğundan tedavide tercih edilebilir.

Bodur ve arkadaşlarının 42 *Brucella melitensis* suşu üzerinde yaptıkları çalışmada seftriakson için $MİK_{50}$ değeri 0.125 µg/ml ve $MİK_{90}$ değeri 0.38 µg/ml olarak saptanmıştır (90). Baykam ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise E test yöntemi ile duyarlılık araştırılmış ve seftriakson için $MİK_{50}$ değeri 0.38 mg/l ve $MİK_{90}$ değeri 0.50 mg/l olarak saptanmıştır (91).

Bu çalışmada seftriaksonun $MİK_{90}$ değeri 1 µg/ml olarak saptanmıştır.

Beta laktam grubu bir antibiyotik olan amoksisilinin $MİK_{90}$ değeri rifampisine benzer şekilde 2 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu bakımdan *Brucella* spp. grubu mikroorganizmalara karşı in vitro ortamda etkinliği iyi olan bir antibiyotik olduğu söylenebilir. Ancak amoksisilinin *Brucella* spp. suşlarına karşı etkinliği konusunda yeterli sayıda çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak *Brucella melitensis* suşlarına karşı yaptığımız duyarlılık testinde kullandığımız antibiyotiklerin düşük $MİK$ değerleri dolayısıyla in vitro etkinlikleri iyi olan antibiyotikler oldukları söylenebilir.

ÖZET

Brucella Suşlarında MIC Yöntemiyle Duyarlılık Araştırması

Bruselloz tüm dünyada sık olarak görülen bir enfeksiyon hastalığıdır. Genelde kırsal kesimlerde görülen bu hastalık Isparta yöresinde de endemik bir seyir göstermektedir. Klinik belirti ve bulguları ile bir çok infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan hastalıklara benzerdir. Bu nedenle tanıda sorunlarla karşılaşılabilir. *Brucella* spp. hücre içi bakterilerdir. Bu nedenle çeşitli tedavi kombinasyonlarına rağmen eradikasyonu zor olup tedavi sonrasında rölapslar ortaya çıkabilmektedir.

Çalışmanın amacı 1999-2005 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları servisinde bruselloz tanısı alan hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Brucella melitensis* suşlarının tetrasiklin, doksisisiklin, rifampisin, seftriakson, amoksisilin, siprofloksasin, levofloksasin ve streptomisine karşı *in vitro* duyarlılıklarını saptamaktır.

İzole edilen 34 suşun duyarlılıkları Broth mikrodilüsyon metodu kullanılarak test edilmiştir. Test için *Brucella* Broth kullanılmıştır.

Bu çalışma göstermiştir ki tetrasiklin, doksisisiklin, siprofloksasin ve levofloksasin *Brucella melitensis* suşlarına karşı *in vitro* koşullarda düşük MİK düzeylerinde etkilidir. Benzer şekilde seftriakson, streptomisin, amoksisilin ve rifampisin de *Brucella melitensis* suşlarına karşı *in vitro* ortamda düşük MİK düzeylerinde etkilidirler.

Anahtar sözcükler: *Brucella*, MİK, Mikrodilüsyon.

SUMMARY

The Sensitivity Research For Brucella Strains by Using MIC

Method

Brucellosis is a worldwide common infection disease. The disease, which is generally seen in the country side, is endemic for Isparta region. The clinical signs and findings look like many other infectious and non-infectious diseases. *Brucella* spp. are intracellular bacterias. Because of this despite of some different treatment combinations the eradication of the disease is difficult and there may occur relapses after treatment.

The aim of the study is to find the in vitro sensitivity of *Brucella melitensis* strains to tetracycline, doxycycline, rifampicin, streptomycin, ciprofloxacin, levofloxacin, ceftriaxone, amoxicillin which were isolated from the blood cultures of the patients who was diagnosed as brucellosis in the Suleyman Demirel University Medical Faculty Clinical Bacteriology and Infectious Diseases Department during 1999 to 2005.

The sensitivity of the 34 strains which were isolated was tested by using Broth microdilution method. Brucella Broth was used for this test.

This study showed that tetracycline, doxycycline, ciprofloxacin and levofloxacin are effective with low MIC levels in vitro conditions against *Brucella melitensis* strains. Similarly ceftriaxone, streptomycin, amoxicillin and rifampicin are also effective with low MIC levels in vitro conditions against *Brucella melitensis* strains.

Key Words: *Brucella*, MIC, Microdilution

KAYNAKLAR

- 1) Baysal B. *Brucella*. Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. I. Baskı Ankara: Öncü Basımevi, 571-77, 1999.
- 2) Young EJ. An overview of human brucellosis. *CID* 21: 283-89, 1995.
- 3) Hoşoğlu S, Kaya H, Çobaner A, Ayaz C, Yılmaz S, Özbek N. Brusellozda kemik sintigrafisinin önemi. *Klinik Derg* 11: 92-94, 1998.
- 4) Agalar C, Usubutun S, Turkyılmaz R. Ciprofloksasin and Rifampicin Versus Doxycycline and Rifampicin in the Treatment of Brucellosis. *Eur Clin Microbiol Infect Dis* 18: 535-38, 1999.
- 5) Akova M, Uzun Ö, Akalın HE, Hayran M, Ünal S, Gür D. Quinolones in treatment of human brucellosis: comparative trial ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1831-34, 1993.
- 6) Wilfert CM. *Brucella*. In: Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM (eds). *Zinsser Microbiology*. Appleton and Lange, 609-14, 1992.
- 7) Daniel S, Jane D. Wong. *Brucella* In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM pres, 625-31, 1999.
- 8) Yagupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *Clin Microbiol* 37: 3437-42, 1999.
- 9) Gürler N. Brusellozda bakteriyolojik tanı yöntemleri. *Klinik Derg* 3 : 21-22, 1990.
- 10) 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. Washington DC: ASM pres, 457-62, 1991.
- 11) Young EJ. *Brucella* species. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practise of Infectious Diseases*. V. Edition Pennsylvania: Churchill Livingstone, Vol 2, 2386-93, 2000.
- 12) Türkçapar N, Kurt H. Bruselloz. Uzun Ö, Ünal S (eds). Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları Cilt 2. Ankara: Bilimsel Tıp yayınevi, 1015-24, 2002.
- 13) Sümerkan B. *Brucella* Türleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Cilt 2. I. Baskı. İstanbul: Nobel Matbaacılık, 1647-52, 2002.
- 14) Ariza J, Pujol M, Valuerde J, et al. Brucellar sacroiliitis: Findings in 63 episodes and current relevance. *CID* 16: 761-65, 1993.
- 15) Bouza E, Torre MG, Parras F, Guerrero A, Rodriguez M, Gobernada J. International notes. *Rev Infection Diseases* 9: 810-22, 1987.

- 16) Demirkan F, Akalin HE, Şimşek H, Özyılkan E, Telatar H. Spontaneous peritonitis due to *Brucella melitensis* in a patient with cirrhosis. *Eur Clin Microbiol Infect Dis* 12: 66-67, 1993.
- 17) Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev Infect Dis* 13: 359-72, 1991.
- 18) Buchanan TM, Faber LC. 2- Mercaptoethanol brucella agglutination test: Usefulness for predicting recovery from brucellosis. *Clin Microbiol* 11: 691-93, 1980.
- 19) Shehabi, A., K. Shakir, M. El-Khateeb, H. Qubain, N. Fararjeh, and A. R. Abu Shamat. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *Infecty* 20: 5-10, 1990.
- 20) Solera J, E. Martinez-Alfaro, and A. Espinosa. Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs* 53: 245-56, 1997.
- 21) Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: A study of 530 cases. *Medicine* 75: 195-211, 1996.
- 22) Young EJ. Brucellosis: Current epidemiology, diagnosis, and management. *Curr Top Infect Dis* 15: 115-28, 1995.
- 23) Buchanan M, Faber LC, Fledman RA. Brucellosis in the United States 1960-1972: an abattoir associated disease. Part I: clinical features and therapy. *Medicine* 53: 403-13, 1974.
- 24) Ariza J, Corredoira J, Pallares R, et al. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *CID* 20: 1241-49, 1995.
- 25) Solera J, Martinez – Alfaro E, Espinoza A, et al. Multivariate model for predicting relapse in human brucellosis. *Infect Dis* 36: 85-92, 1998.
- 26) Lulu AR, Araj GF, Khateeb MI. Human brucellosis in Kuwait: a prospective study of 400 cases. *Q Med* 249: 39-54, 1988.
- 27) Solera J, Rodriguez-Zapata M, Geijo P et al. Doxycycline-rifampin versus doxycycline-streptomycin in treatment of human brucellosis due to *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2061-7, 1995.
- 28) Solera J, Espinosa A, Geijo P, et al. Treatment of human brucellosis with netilmicin and doxycycline. *CID* 22: 441-5, 1996.
- 29) Spink WW. What is chronic brucellosis? *Ann Intern Med* 35: 258-74, 1951.
- 30) Martin WJ, Nichols DR, Beahrs OH. Chronic localized brucellosis. *Arch Intern Med* 107: 143-48, 1961.
- 31) Weed LA, Dahlin DC, Pugh DG, et al. *Brucella* in tissues removed at surgery. *Am Clin Pathol* 22: 10-21, 1952.

- 32) Al Aska AK. Gastrointestinal manifestations of brucellosis in Saudi Arabian patients. *Trop Gastroenterol* 10: 217-19, 1989.
- 33) Mohammed AES, Ven D, Madkour MM, et al. Alimentary tract presentations of brucellosis. *Ann Saudi Med* 6: 27-31, 1986.
- 34) Petrella R, Young EJ. Acute brucella ileitis. *Am Gastroenterol* 83: 80-82, 1988.
- 35) Jorens PG, Michielsen PP, Van den Ender EJ, et al. A rare cause of colitis-*Brucella melitensis*. *Dis Colon Rectum* 34: 194-96, 1991.
- 36) Ariza J, Pigrau C, Canas C, Marron A, Martinez F, Almirante B, et al. Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. *CID* 32: 1024-33, 2001.
- 37) Yaylı G, İşler M, Oyar O. Medically treated splenic abscess due to *Brucella melitensis*. *Scand Infect Dis* 34: 133-35, 2002.
- 38) Gürsoy Ş, Baskol M, Özbakır Ö, Güven K, Patiroğlu T. Spontaneous bacterial peritonitis due to *Brucella* infection. *Turk Gastroenterology* 14: 145-47, 2003.
- 39) Andriopoulos P, Tsironi M, Asimakopoulos G. Acute abdomen due to *Brucella melitensis*. *Scand Infect Dis* 35: 204-05, 2003.
- 40) Solera J, Lozano E, Martinez-Alfaro E, Espinoza A, Castillejos ML, Abad L: *Brucellar spondylitis: review of 35 cases and literature survey*. *CID* 29: 1440-49, 1999.
- 41) Gotuzzo E, Carillo C. *Brucella*. Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds), *Infectious Diseases* II, ed, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1837-45, 1998.
- 42) Ateş Ö, Çaylı SR, Koçak A, Kutlu R, Önal RE, Tekiner A. Spinal epidural abscess caused by *Brucellosis*. *Neurol Med Chir* 45: 66-70, 2005.
- 43) Keles C, Bozbuga N, Sismanoglu M, et al. Surgical treatment of brucella endocarditis. *Ann Thorac Surg* 71: 1160-3, 2001.
- 44) Al-Kasab S, Al-Fagih MR, Al-Yousef S, et al. *Brucella* infective endocarditis: successful combined medical and surgical therapy. *Thorac Cardiovasc Surg* 95: 862-7, 1988.
- 45) Pappas G, Bosilkovski M, Akritidis N, Mastora M, Krteva L, Tsianos E. *Brucellosis and Respiratory System* *CID* 37: e95-9, 2003.
- 46) Mili N, Auckenthaler R, Nicod LP. Chronic brucella empyema. *Chest* 103: 620-21, 1993.
- 47) Kerem E, Diav O, Navon P, Branski D. Pleural fluid characteristics in pulmonary brucellosis. *Thorax* 49: 89-90, 1994.
- 48) Cobo F, Aliaga L, de Cueto M, Cueto A, de La Rosa M. Solitary lung nodules produced by *Brucella melitensis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19: 452-53, 2001.

- 49) Jubber AS, Gunawardana DR, Lulu AR. Acute pulmonary edema in *Brucella* myocarditis and interstitial pneumonitis. *Chest* 97: 1008-9, 1990.
- 50) Patel PJ, Suhaibani H, Al-Aska AK, Kolawole TM, Al-Kassimi FA. The chest radiograph in brucellosis. *Clin Radiol* 39: 39-41, 1988.
- 51) Özişik HI, Ersoy Y, Tevfik MR, Kızgın S, Özcan C. Isolated intracranial hypertension : a rare presentation of neurobrucellosis. *Microbes and Infect* 6: 861-63, 2004.
- 52) R.A. Shakir, A.S.N. Al-Din, G.F. Araj, A.R. Lulu, A.R. Mousa, M.A. Saadah. Clinical categories of neurobrucellosis: a report on 19 cases. *Brain* 110: 213-23, 1987.
- 53) Tsirka A, Markesinis I, Getsi V, Chaloulou S. Severe thrombocytopenic purpura due to brucellosis. *Scand Infect Dis* 34: 535-6, 2002.
- 54) Sevinc A, Kutlu NO, Kuku I, Ozgen U, Aydogdu I, Soylu H. Severe epistaxis in brucellosis-induced isolated thrombocytopenia: a report of two cases. *Clin Lab Haematol* 22: 373-5, 2000.
- 55) Gungur K, Bekir NA, Namiduru M. Ocular complications associated with brucellosis in an endemic area. *Eur Ophthalmol* 12: 232-7, 2002.
- 56) Odeh M, Oliven A. Acute brucellosis associated with massive proteinuria. *Nephron* 72: 688-9, 1996.
- 57) Altıparmak MR, Pamuk GE, Pamuk ON, Tabak F. *Brucella* glomerulonephritis: review of the literature and report on the first patient with brucellosis and mesangiocapillary glomerulonephritis. *Scand Infect Dis* 34: 477-80, 2002.
- 58) Siegelmann N, Abraham AS, Rudensky B, Shemesh O. Brucellosis with nephrotic syndrome, nephritis and IgA nephropathy. *Postgrad Med* 68: 834-6, 1992.
- 59) Özsoy MF, Koçak N, Çavuşlu Ş. *Brucella* orşiti: 5 olgu sunusu. *Klimik Derg* 11: 85-88, 1998.
- 60) Navarro-Martinez A, Solera J, Corredoira J, Beato JL, Martinez-Alfaro E, Atienzar M, Ariza J. Epididymoorchitis due to *Brucella melitensis*: a retrospective study of 59 patients. *CID* 33: 2017-22, 2001.
- 61) Fenkci V, Cevrioglu S, Yılmaz M. Ovarian abscess due to *Brucella melitensis*. *Scand Infect Dis* 35: 762-63, 2003.
- 62) Ozturk R, Mert A, Kocak F, Ozaras R, Koksall F, Tabak F, Bilir M, Aktuglu Y. The diagnosis of brucellosis by use of BACTEC 9240 blood culture system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44: 133-5, 2002.
- 63) Nolte FS, Williams JM, Jerris RC et al. Multicenter clinic evaluation of a continuous monitoring blood culture system using a fluorescent-sensor technology. *Clin Microbiol* 29: 287-90, 1993.

- 64) Hardy DJ, Hulbert BB, Migneault PC. Time of detection of Bact Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5 to 7 day negative cultures. *Clin Microbiol* 30: 2743-45, 1992.
- 65) Özkurt Z, Erol S, Tasyaran MA, Kaya A. Detection of *Brucella melitensis* by the BacT/Alert automated system and *Brucella* broth culture. *Clin Microbiol and Infection* 8: 749-52, 2002.
- 66) Solomon MH, Jackson D. Rapid Diagnosis of *Brucella melitensis* in blood: some operational characteristics of the BacT/Alert . *Clin Microbiol* 30: 222-24, 1992.
- 67) Casas J, Partal Y, Llosa J, Leiva J, Navarro JM, Rosa M. Detection of *Brucella* with an automatic hemoculture system: BacT/Alert. *Enferm Infect Microbiol Clin* 12: 497-500, 1994.
- 68) Gedikoglu S, Helvacı S, Ozakin C, Gokirmak F, Kilicturgay K. Detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR 730 and BACTEC 9120 systems. *Eur Epidemiol* 12: 649-50, 1996 .
- 69) Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z. Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *Clin Microbiol* 35: 2673-4, 1997.
- 70) Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, III. Baskı. İzmir, Şafak Matbaacılık, 2002.
- 71) Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji*, VIII. Baskı. İzmir, Şafak Matbaacılık, 1993.
- 72) Araj, G.F., A.R. Lulu, M.A. Saadah, A.M. Mousa, I. L. Strannegard, R.A. Shakir. Rapid diagnosis of central nervous system brucellosis by ELISA. *Neuroimmunol* 12: 73-82, 1986.
- 73) Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 4: 115-23, 2004.
- 74) Sırmatel F. *Brusellozis*. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi kitabı 33-35, 2001.
- 75) Rubinstein E, Baldwin C. Management and pathogenesis of brucellosis, JC Pechere ed, In. *Intracellular bacterial infections*, Cambridge Medical Publications 87-98, 1996.
- 76) Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Güncel bilgiler ışığında Antibiyotikler. I. Baskı. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003.
- 77) Solera J, Martinez-Alfaro E, Saez L, et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin: a meta-analysis of randomized controlled trials. In: Program and abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 4-7 Oct 1994; Orlando. Washington, DC: American Society for Microbiology, 261, 1994.
- 78) Ariza J, Guidol F, Pallares R et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampicin or doxycycline plus streptomycin: a randomized, double-blind study. *Ann Intern Med* 117: 25, 1992.

79) Lang R, Rubinstein E. Quinolones for the treatment of brucellosis. *Antimicrob Chemother* 29: 357-60, 1992.

80) NCCLS MİK Testleri Ek Tablolar M100-S13 (M7), 2003.

81) Aerop Üreyen Bakteriler için Dilüsyon Yöntemi ile Antimikrobik Duyarlılık Testleri; Onaylanmış Standart Altıncı Baskı. NCCLS M7-A6, 2003

82) Bosch J, Linares J, Lopez de Goicoechea MJ, Ariza J, Cisnal MC, Martin R. In vitro activity of ciprofloxacin, ceftriaxone, and five other antimicrobial agents against 95 strains of *Brucella melitensis*. *Antimicrobiol Chemother* 17: 459-61, 1986.

83) Trujillano-Martin I, Garcia-Sanchez E, Martinez IM, Fresnadillo MJ, Garcia-Sanchez JE, Garcia-Rodriguez JA. In vitro activities of five new antimicrobial agents against *Brucella melitensis*. *Int Antimicrob Agents* 12: 185-86, 1999.

84) Trujillano-Martin I, Garcia-Sanchez E, Martinez IM, Fresnadillo MJ, Garcia-Sanchez JE, Garcia-Rodriguez JA. In vitro activities of six new fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 194-5, 1999.

85) Akova M, Gür D, Kocagöz T, Livermore D. *Brucella melitensis*' e karşı çeşitli antibiyotiklerin ve kombinasyonların farklı pH değerlerinde etkinliği. *Ankem Derg* 9: 136, 1995.

86) Akova M, Gur D, Livermore DM, Kocagöz T, Akalin HE. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1298-300, 1999.

87) Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamanstein L, Joseph G, Anderson M, Harrison K. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1925-7, 1991.

88) Qadri SM, Ueno Y. Susceptibility of *Brucella melitensis* to the new fluoroquinolone PD 131628: comparison with other drugs. *Chemotherapy* 39: 128-31, 1993.

89) Garcia-Rodriguez JA, Munoz Bellido JL, Fresnadillo MJ, Trujillano I. In vitro activities of new macrolides and rifapentine against *Brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 911-3, 1993.

90) Bodur H, Balaban N, Aksaray S, Yetener V, Akinci E, Colpan A, Erbay A. Biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates. *Scand Infect Dis* 35: 337-8, 2003.

91) Baykam N, Esener H, Ergonul O, Eren S, Celikbas AK, Dokuzoguz B. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *Int Antimicrob Agents* 23: 405-7, 2004.

92) Kocagöz S, Akova M, Altun B, Gur D, Hascelik G. In vitro activities of new quinolones against *Brucella melitensis* isolated in a tertiary-care hospital in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 8: 240-2, 2002.

93) Yorgancigil H, Yayli G, Oyar O. Neglected case of osteoarticular *Brucella* infection of the knee. *Croatian Medical* 44: 761-3. 2003.