

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL FARE BRUSELLOZ  
MODELİNDE DOKSİSİKLİN İLE  
LEVOFLOKSASİNİN ETKİSİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**TEZ YÖNETİCİSİ**

**Prof.Dr. Yusuf ÖZBAL**

**Dr. Cem ARTAN  
UZMANLIK TEZİ  
KAYSERİ, 2001**

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. TARİHÇE.....	2
2.2. MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ.....	3
2.3. ÜREME VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER.....	4
2.4. KLİNİK GÖRÜNÜMLERİ VE PATOGENEZİ.....	5
2.5. LABORATUVAR TANI.....	8
2.5.1. Bakteriyolojik Tanı.....	8
2.5.2. Serolojik Testler.....	12
2.6. ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK VE TEDAVİ.....	13
2.7. EPİDEMİYOLOJİ VE KORUNMA.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ.....	16
3.2. BAKTERİ SUŞUNUN SEÇİMİ.....	17
3.3. DENEY HAYVANLARI.....	18
3.3.1. Deney Hayvanlarına Bakteri İnokülasyonu.....	18
3.4. ANTİBİYOTİKLER VE UYGULAMA YOLLARI.....	18
3.5. DALAK KÜLTÜRLERİNİN HAZIRLANIŞI.....	19
3.6. ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİN ÖLÇÜLMESİ.....	20
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. BRUSSELLA İLE İNFEKTE EDİLEN FARELERİN ANTİBAKTERİYEL TEDAVİ BULGULARI.....	21
4.2. İNFEKSİYON-DALAK İLİŞKİSİ.....	23
4.3. MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYON BULGULARI.....	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	25
6. ÖZET.....	30
7. SUMMARY.....	31
8. KAYNAKLAR.....	32

## KISALTMALAR

$\mu\text{m}$	: Mikrometre
nm	: Nanometre
S	: Smooth
R	: Rough
RES	: Retiküloendotelial Sistem
WAT	: Wright Aglütinasyon Testi
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
RIA	: Radio Immuno Assay
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
i.p.	: İntraperitoneal
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
SF	: Serum Fizyolojik
g	: Gram
MIC	: Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
KDO	: 2- keto-3-deoksioktilosonik asit
TMP/SMZ	: Trimetoprim/sulfametoksazol

## **TABLO LİSTESİ**

Tablo 1. Brucella türlerinin diğler nazlı Gram negatif kokobasillerden ayırımı

Tablo 2. Brusella cinsinde tür ve biyotiplerin karakteristik ayırımı

Tablo 3. Tedavi sonrası üreyen brusella bakteri koloni sayıları

Tablo 4. Brusella bakterileri ile infekte edilen farelerin antibakteriyel tedavi bulguları

Tablo 5. Brusella bakterileri ile infekte edilen ve antibakteriyel tedavi edilen farklı grupların dalk ağırlıkları ortalamaları

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Brusella hücre içi yerleşen ve memeliler arasında geniş bir konak dağılımı gösteren fakültatif intrasellüler bir bakteridir (1).

Brusella cinsi bakterilerle oluşan bruselloz, titreme ile yükselen ateş, kas ve büyük eklem ağrıları ile seyreden bir zoonozdur (2,3,4). Brusella bakterileri; koyun, keçi sığır, manda ve domuz gibi hayvanların etleri, süt, idrar gibi vücut sıvıları, infekte süt ile hazırlanan süt ürünleri, infekte hayvanın gebelik materyali aracılığı ile insanlara bulaşır (1,5).

Brusellozda klasik tedavi süresinin uzunluğu, tedavilerdeki yetersizlikler ve nüksler, kullanılan antibiyotiklerin yan etkileri nedeniyle yeni ilaçların denenmesine gerek duyulmuştur. *İn vitro* çalışmaların sonuçları ile klinik sonuçların korelasyonu önemlidir (6). Hücre içi penetrasyonu çok iyi olan yeni kinolonların tedaviye girişi ümit vericidir (7).

Bu çalışmada yeni kinolonlardan levofloksasin'in *in vivo* olarak *Brucella melitensis* (biyovar-3) laboratuvar suşuna etkinliği klasik tedavi yöntemlerinden biri olan doksisisiklin tedavisi ile karşılaştırıldı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TARİHÇE

Bruselloz, ilk defa Marston tarafından 1859 yılında Kırım Savaşı esnasında Malta adasında, halsizlik, yorgunluk, kaslarda bitkinlik, ateş, zayıflama ile seyreden, “Mediterranean gastric remittent fever” olarak tanımlanan bir hastalıktır (1,4). Bruselloz’un etkeni ise Bruce tarafından 1886 yılında Malta Humması adı verilen hastalıktan ölmüş İngiliz askerlerinin dalağında izole edilmiş ve *Micrococcus melitensis* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra bu bakterinin adı *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) olarak değiştirilmiştir (4,5,8).

Brucella cinsi üyeleri ile değişik infeksiyonlar tanımlanmıştır. Nocard, 1862 yılında *B. abortus*’un fetal membranlarda ve gebe sığırların uterus membranlarında bulunduğunu bildirmiş ise de bu bakterinin izolasyonu Bang tarafından 1897 yılında ineklerin düşük materyalinden yapılmıştır (1,8).

Cinsin üçüncü üyesi olan *B. suis*; 1914 yılında Traum tarafından Amerika Birleşik Devletleri’nin Indiana eyaletinde prematüre doğan domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden izole edilmiştir (5,8).

Brusella'nın günümüzde tanımlanmış altı türü bulunmaktadır. Bunlar *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotoma* ve *B. canis*'dir. *B. ovis* ve *B. neotomae*'nin insanda nadiren enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (9).

## 2.2. MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ

Brusella bakterileri, 0.5-0.7 µm (mikrometre) eninde, 0.6-1.5 µm boyunda, Gram negatif mikroorganizmalardır. Bazen bipolar boyanırlar, aside dirençli değildirler ancak zayıf asitler ile dekolorizasyona dayanıklıdırlar ve Macchiavello boyama veya Stamp ve ark, (1950)'nin kullandığı modifiye Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile kırmızı boyanırlar (10). Kok, kokobasil ya da kısa zincir halinde, tek tek, nadir olarak gruplar halinde görülürler (3,10). Gerçek kapsül üretmezler, hareketsiz ve sporsuzdurlar (2,5,10,11).

Brusella bakterilerinin ince yapısı, diğer Gram negatif bakterilere benzemekle birlikte *Escherichia coli* ile özdeşleştirilen Enterobacteriaceae üyelerinden önemli farklılıklar gösterirler (10). Brusella hücre duvarının en dışında 9 nanometre (nm) kalınlığında lipopolisakkarit-protein tabaka ve dışa doğru uzanan polisakkarit zincirler bulunur. Bu bölge, hem S (smooth) tipi koloni yapan hem de S tipi koloni yapmayan bakterilerde majör yüzey antijenlerinin yerleşim yeridir. Lipopolisakkarit-protein tabaka, 3-5 nm kalınlığında elektron yoğun müramik asit içeren peptidoglikan tabakasına iç katmanda bağlıdır. Brusella'da bu tabaka *E. coli*'dekinden daha çok göze çarpar (8,10). Daha içte S tipi koloni yapan bakterilerde 3-6 nm kalınlığında düşük elektron yoğunluklu periplazmik alan, S tipi koloni yapmayan bakterilerde 30 nm' ye kadar çıkmaktadır. Diğer bakterilerde hücre duvar sentezi ve hücre bölünmesi sırasında görev alan periplazmik enzimlerin yerleştiği bu bölgenin işlevi brusella'lar da tam olarak bilinmemektedir. Doğal haptenler ve polisakkarit B gibi hücre duvar komponentlerinin burada yerleştiği düşünülmektedir. Periplazmik aralığın altında yer alan sitoplazmik membran, tipik üç katmanlı lipoprotein yapıdadır. Brusella bakterilerinin sitoplazması oldukça homojen olup, küçük vakuol ve polisakkarit içeren granüller bulundurur (10).

Brusella hücresinin kimyasal analizi detaylı olarak belirlenememiştir. S tipi koloni yapan bakterilerin hücre duvarında %37 protein, %14 karbonhidrat, %18 lipid, %0.46 müramik asit ve %0.1 2-keto-3- deoksioktilosonik asit (KDO) bulunur. S tipi koloni yapmayanlarda ise hücre duvarı %47.5 protein, %13 karbonhidrat, %17 lipid, %0.4 müramik asit ve %0.1 KDO vardır (10).

### 2.3. ÜREME VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER

Pek çok Brusella suşu ilk izolasyonda yavaş üreyen, nazlı mikroorganizmalardır. Koloniler, 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra ancak görülebilir duruma gelir. İlk izolasyonlarında kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Doku özeti, kan, serum, triptoz gibi kompleks peptonlu, glikoz ve tuz içeren besiyerlerinde iyi ürerler (5,9,10,11). Kemoorganotrofik bakterilerdir. Birçok suş pek çok amino asit, tiamin, nikotin amid ve magnezyum içeren besiyerlerine ihtiyaç duyar (2). Zengin besiyerlerinde düzgün kenarlı, konveks, nemli, parlak koloniler oluştururlar. Kolonileri hemolizsiz ve pigmentsizdir. *B. melitensis* ve *B. abortus*' un bazı suşlarının kolonileri, eski kültürlerde esmer renkte görülebilir. *B. ovis* ve *B. canis* kolonileri normal olarak pürüzlü R (rough) koloni şeklindedir (5).

Brusella bakterileri zorunlu aéropturlar. Pek çok suş, özellikle ilk izolasyonda %5-10 CO<sub>2</sub>'e ihtiyaç duyar. Optimal üreme ısısı 37°C olup 20-40°C'de üreyebilirler. Optimal üreme pH'sı 6.7-7.4'dür. Brusella'lar katalaz ve genellikle oksidaz pozitifler (9). Nitratları nitritlere çevirmezler. *B. neotomae* dışında karbonhidratlardan asit yapmazlar. İndol oluşturmazlar. Eritrositleri parçalamazlar. Voges-Proskauer testi, sitrat ve metil kırmızısı testleri negatiftir. Brusella'larda G+C oranı %55-58 mol'dür (2,5,10,11).

Brusella cinsi mikroorganizmalar 60°C'de 10 dakika (dk) da, % 1 fenolde 15 dk'da ölür. Normal mide asiti mikroorganizmayı öldürmeye yeterlidir. Ancak *B. melitensis* mide asitine *B. abortus*'tan daha dirençlidir. Bunun yanında hayvanların barındığı ahır tozlarında altı hafta, suda 10 hafta canlılığını sürdürebilir. Düşük yapmış hayvan fetüsünde 75 gün, infekte çiğ süttten yapılmış dondurmada 30 gün, çiğ



sütten yapılmış tuzsuz krema yağında buzdolabında 142 gün, %10 tuz içeren salamura peynirinde 45 gün, %17 tuz içerenlerde ise bir ay yaşayabilir (3,4,5).

*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, A ve M olarak isimlendirilen, ısıya dayanıklı, aglütinasyon reaksiyonlarından sorumlu, yüzey antijenlerine sahiptirler. *B. abortus* ve *B. suis*'de A antijeni fazla, M antijeni az, *B. melitensis* de ise M antijeni fazla, A antijeni az miktarlardadır. Bu miktarlar oran olarak ifade edildiğinde, *B. abortus* ve *B. suis* de A'nın M' ye oranı 20/1 iken, *B. melitensis* de bu oran 1/20' dir (5,11,12).

Brusella'ların, ayrıca Salmonellaların Vi antijenlerine benzeyen L antijenleri de gösterilmiştir. Daha çok *B. abortus* tiplerinde bulunmuş olan L antijeni, yeni izole edilen bakterilerde de var olup, onların immün serumlarla aglütinasyonuna engel olmaktadır. Bu olay, serum 100°C'de 30 dk ısıtıldıktan sonra ortadan kalkmaktadır (5,12).

Brusella cinsi bakteri antijenlerinin *Yersinia enterocolitica*, *Francisella tularensis* ve *Vibrio cholerae* gibi bakteriler ile çapraz reaksiyon verdiği belirlenmiştir (5).

Brusellaların antijenik yapısında S-R değişikliğine bağlı farklılıklar bulunur. Bu farklılıkların genetik ve fizyolojik mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (5,10).

## 2.4. KLİNİK GÖRÜNÜMLERİ VE PATOGENEZİ

Brusella bakterilerinin virülansının dayandığı esas tam olarak bilinmemektedir. Bakterilerde ekzotoksin bulunmamıştır. Bununla beraber Brusella'ların hücre maddeleri toksiktir. Saf olarak elde edilen bir endotoksinin fareler için çok toksik olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber bu endotoksin niteliğindeki madde, gerek virulan ve gerekse avirulan kökenler de aynı yapı ve miktarda bulunmuştur. Bu maddenin hastalık oluşturmada rolü olduğu kabul edilmekle beraber virulan kökenlerin avirulanlara göre hücre içinde daha çabuk

üredikleri belirtilmektedir. Daha çok *B. melitensis*'de S-R varyasyonu ile birlikte geriye dönüşü olmayacak şekilde bir virulans azalması görülür (1,12).

*B. melitensis*'in daha çok keçi, koyun, sığır ve domuzlarda; *B. abortus*'un en çok sığır ve sonra domuz, keçi ve koyunlarda; *B. suis*'in ise daha çok domuz ve sonra sığır, at gibi hayvanlarda infeksiyon yaptıkları bilinmektedir. Fakat bu bakterilerin, içine insanları da alan geniş bir hayvan topluluğu için patojen oldukları bilinmektedir (12).

Hayvanlardaki bruselloz akut veya kronik seyirlidir. Sepsis, dişi hayvanlarda genital organ infeksiyonu ve abortus, erkek hayvanlarda orşit olabilir. Bakteriler süt veren hayvanlarının memelerine de yerleşerek süt ile dışarı atılabilirler (12). Hayvanın fetüs zarlarında brusellalar için gelişme faktörü olan eritritol yapısında bir madde belirlenmiş olup, gebe hayvanların brusellalara karşı duyarlı olmaları bu şekilde açıklanmaktadır. İnsan plasentasında eritritol bulunmaz. Bundan dolayı, insanlarda genellikle, brusella infeksiyonlarında abortuslara rastlanmaz (5).

Brusella infeksiyonu insanlara iki yoldan bulaşmaktadır. Birincisi, kontamine çiğ süt içilmesi veya süt ürünlerinin yenmesi, ikincisi infekte hayvanlar ile temasdır. Keçi ve koyun sütünden yapılmış taze peynirler ile *B. melitensis* bulaşmaktadır. Mezbaha işçilerinde, hayvan kesicilerinde, et ile çalışan işçilerde ve veterinerlerde görülen bulaş şekli; bakterilerin özellikle ellerdeki çizik, sıyrık ve yaralardan vücuda girmesi ile olur. İnfekte hayvanların genital salgılarında da etken bulunmaktadır (5). Ayrıca mezbaha işçilerinde, veterinerlerde ve laboratuvar çalışanlarında hastalığın infekte aerosollerle bulaştığı, bildirilen tüm bruselloz olgularının % 2'sinin laboratuvarda edinildiği bildirilmiştir. İnsandan insana bulaş da nadir olarak görülmektedir (13,14).

Brusella bakterisi, gastrointestinal sistem, deri, nadiren de solunum yolu veya diğer mukoza yüzeylerinden alındıktan sonra, ilk üremesini mezenterik, aksiller, servikal, supraklaviküler lenf bezlerinde yapar. Bakterinin oral yoldan alınımında mide asidinin yetersizliği veya herhangi bir ilaçla ya da diet ile nötralize edilmiş olması, bakterinin geçişini kolaylaştırır (3). Brusella bakterisi ilk üremesini

bölgesel lenf bezlerinde yaptıktan sonra hematojen yolla retiküloendotelial sistem (RES) organlarına yayılır. Yerleştiği başlıca organlar; karaciğer, dalak, kemik iliği, böbrek, santral sinir sistemi, endokard, kemik, büyük eklemler, akciğer, testis ve overlerdir. Brusella cinsi bakteriler fakültatif intrasellüler patojenler olup, konağın fagositik hücreleri içinde çoğalabilirler. Özellikle karaciğer, dalak ve kemik iliğinde epitelooid hücreler, plazma hücreleri ve mononükleer hücrelerle çevrili granülomlar, brusellozdaki karakteristik histopatolojik görünümü oluşturur (3,5).

Hastalığın kuluçka süresi bir-üç hafta arasında değişirse de, bazen altı-yedi haftayı bulmaktadır. Ateş yükselmesi, bazen titreme ile olabilir. Hastalık gece terlemeleri, bitkinlik, daha çok diz, bel ve dirsek gibi büyük eklemlerde ağrılar ve kilo kaybı gibi belirtiler ile kendini belli eder. Her hasta değişebilen farklı klinik tablolar gösterebilir. Ateş özellikle *B. melitensis* infeksiyonlarında 10-15 gün 38-39° C, bazen daha yükseğe çıkar ve sonra yine basamak basamak iner, iki hafta içinde normale döner. Üç-beş bazen 10 günlük ateşsiz bir devreden sonra yeni bir dalga şeklinde tekrarlar (ondülan ateş). Hasta ateşsiz dönemlerde kendini iyi hisseder. Klinik olarak; subklinik, akut, subakut ve kronik bir seyir saptanır (3,5,11,12).

Bruselloz'un nörolojik belirtileri menenjit, ensefalit, meningovasküler komplikasyonlar ve psikoza kapsar. Nadir vakalarda intraserebral ve epidural apseler bildirilmiştir (4).

Osteoartiküler bulgular %20-60 hastada görülür. Kemik ve eklem yerleri ile ilgili bulgular, artrit, spondilit, osteomyelit, tenosinovit ve bursittir. Sakroileit en sık bildirilen komplikasyondur. Endokardit olguların % 2'sinden azında görülürken bruselloza bağlı ölümlerin temel sebebidir. Brusellozlu hastaların %25'inde solunum yolu ile ilgili semptomlar görülür. Kontamine aerosolün inhalasyonu veya akciğerlere bakteriyemik yayılım ile ortaya çıkar. Grip benzeri semptomlardan, akciğer apsesi ve pleural effüzyona kadar çeşitli şekillerde görülür. Brusellozlu hastaların idrarından brusella bakterisi izole edilmesine rağmen genitoüriner komplikasyonlar nadirdir. Erkeklerde unilateral epididimo-orşit en sık görülen tablodur (4).

## 2.5. LABORATUVAR TANISI

### 2.5.1. Bakteriyolojik Tanı

Brusellozun tanısı organizmanın üretilmesi ile konur. Örnek alınımından mümkün olduğu kadar kısa bir sürede ekilmeli, eğer mümkün değilse buzdolabında saklanmalıdır. Brusella' lar sıklıkla kan ve kemik iliğinden izole edilir. Ayrıca dalak ve karaciğer biyopsi materyalinden ve apselerden de izole edilebilir. Brusellozun tanısında direkt Gram boyama klinik materyallerin özelliği dolayısıyla az öneme sahiptir (2).

Brusella' nın en sık izole edildiği klinik örnekler kan ve kemik iliği aspiratlarıdır. Brusella için kültür sıvı besiyeri bazlıdır ve uzun inkübasyon gerektirir. Kültür bifazik Castaneda besiyeri ile de yapılabilir (2).

Brusellozlu hastalarda kan kültürleri % 53.4 - % 90 pozitifdir. Fakat mikroorganizmanın izolasyonunda başarı şansı zamanla azalmaktadır. Kemik iliği, karaciğer dokusu veya lenf nodlarının kültürlerinin mikroorganizmanın izolasyon şansını arttırdığı bildirilmektedir (13).

### Sıvı Besiyeri Yöntemleri

**Konvansiyonel yöntemler:** Steril vücut boşluklarından Brusella' nın izolasyonu rutin kültür yöntemleriyle mümkün olmasına rağmen, mikroorganizmanın yavaş üremesi nedeniyle sıklıkla mikroorganizmanın tanımlanmasına engel olmaktadır. Ancak klinisyenin ve laboratuvar personelinin muhtemel brusellozun farkında olması rutin kan kültürlerinin 5-7 günde atılmamasını, inkübasyonun 30 güne kadar yükseltilmesini ve böylece Brusella' nın yakalanmasını sağlayabilir. İzolasyonda kör pasajların önemi göz ardı edilmemelidir (13).

**Bifazik yöntemler:** Bifazik besiyerleri, tekrarlanan pasajlardan kaçınabilmek için geliştirilmiş, aynı kan kültür şişesinin içerisinde katı ve sıvı

besiyerleri bulunduran düzeneklerdir. Castaneda besiyeri olarak adlandırılan düzenekte her üç günde bir sıvı besiyerinin katı besiyerinin yüzeyine akışı sağlanır ve bu döngüye en az 35 gün devam edilir. Yöntemin bir hafta içinde pozitifleştiği bildirilmiştir (13). Son yıllarda geliştirilen bir başka bifazik yöntem “Hemoline performance diphasic” besiyeridir. Yaklaşık olarak yedi gün izolasyon için yeterlidir (13,15).

**Lizis santrifügasyon yöntemi:** Brusella türlerini kandan belirlemek için membran filtre tekniği kullanımıdır. Heparinize kan örneği ozmotik lizise maruz bırakılır ve negatif basınç altında steril milipor filtreden süzülür. Filtreler daha sonra katı besiyerine yerleştirilir ve filtrelerde kalan bakteri agar yüzeyinde ürer. Yöntem zor bir teknik olması ve filtrelerde kan elemanlarında yoğun şekilde kalması nedeniyle hiçbir zaman kullanışlı olamamıştır. Orijinal yöntemin kan hücrelerinin ozmotik parçalanmasından sonra eklenen santrifüj basamağının ardından konsatremateryalin agara ekilmesi ile modifiye edilmiştir. Bu yöntem yaklaşık olarak 3.5 günlük belirleme süresi ile tanı süresini kısaltırken duyarlılığının otomatize kan kültür sistemlerinden düşük olduğu bildirilmiştir (13,16).

### **Otomatize kan kültür sistemleri**

**Radyometrik sistemler:** Son yirmi yılda geliştirilen otomatize kan kültür sistemlerinin ilki Bactec 460'dır. Çalışmalar brusella'nın kandan izolasyonunda sistemin yeterli olmadığını göstermiştir (13,16).

**İnfrared tanımlama sistemi:** Çalışmalar brusella türlerinin tanımlanmasında infrared tanımlama tekniklerinde sınırlı kullanım alanı olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada besiyeri pH'sının 6.2'ye getirilmesi ve % 0.3 sodyum pirüvat eklenmesi ile bakteriyel türbiditenin ilk gününde pozitif üreme değeri gösterilmiştir (13,15).

**Devamlı monitörize sistemler:** Tam otomatize “devamlı monitörize” kan kültür sistemleri kandaki bakteri ve mantarların tanısında geliştirilen en yeni

sistemlerdir. Bahsedilen sistemler; Bact/Alert (Organon Teknika), Bactec 9000 ve ESP sistemleridir. Bu sistemlerin hepsinin ortak özelliği kültür şişelerinin devamlı monitörize edildikleri (yaklaşık olarak on dakika aralıklarla) bir cihaz içinde inkübasyonudur. Sistem gaz üretimi ve/veya tüketimini izlemekte bilgiler bilgisayarlara aktarılmakta ve hızlı bir şekilde mikrobiyal üreme belirlenmektedir. Sistemler CO<sub>2</sub> veya diğer gazları belirleyebilmek için kolorimetrik, floresan veya manometrik yöntemler ile üremeyi belirlerler (17).

Yapılan çalışmalarda Bactec 9000 sistemlerinin özellikle bu nazlı mikroorganizma ile infeksiyonun yaygın olduğu bölgelerde Brusella bakteriyemisinin hızlı tanısı için son derece gerekli olduğu bildirilmektedir (18). Bact/Alert standart aerob kültür şişeleri ile inkübasyon periyodunun sadece 2.8 gün olduğu bildirilmektedir (19).

## **Tiplendirme**

Brusella türleri benzer mikroorganizmalardan bazı reaksiyonlarla ayrılırlar (Tablo 1). Hastaların tedavisinde cins seviyesinde tanımlama yeterlidir. Tür ve/veya biyovar seviyesinde tanımlama epidemiyolojik çalışmalar için yardımcı olabilir. Brusella türleri için kültür doğrulaması brusella antiserumu ile yapılabilmektedir. Bu test kültürü Brusella olarak doğrulayabilmekte ancak tür düzeyinde ayırım yapmamaktadır. *Afipia clevelandensis*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* ve *Yersinia enterocolitica* O:9 gibi bazı mikroorganizmalar ile çapraz reaksiyonlar bildirilmiştir. Özellikle Brusella türleri ile Gram boyama özelliği benzer olan *F. tularensis* üre testi ve üreme özellikleri ile ayrılabilir (2).

Tür seviyesinde tanımlama referans laboratuvarlarında deneyimli personel tarafından yapılmalıdır. Tür seviyesinde tanımlama için gerekli testler; CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S üretimi, üre hidrolizi, boya duyarlılıkları ve faj duyarlılığıdır (Tablo 2).

Tablo 1 Brucella türlerinin diğer nazlı Gram negatif kokobasillerden ayırımı (2)						
Test	Brucella spp.	Bordetella bronchiseptica	Acinetobacter spp.	Moraxella phenylpyruvica	Oligella ureolytica	Haemophilus influenza
Brucella antiserumunda Aglütinasyon	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
Oksidaz	+ <sup>a</sup>	+	-	+	+	+
Hareket	-	+	-	-	+/-	-
Ure	+	+	+/-	+	+	+/-
Nitrat redüksiyon	+	+	-/+	+	+	NA <sup>b</sup>
Kanlı agarda üreme	+	+	+	+	+	-
Gram boyamada morfoloji	Zayıf boyanan küçük kokobasil	Parlak boyanan küçük basil ve kokobasiller	Parlak boyanan büyük kokobasiller	Parlak boyanan kokobasiller	Küçük kokobasiller	Küçük kokobasiller
<sup>a</sup> B. canis oksidaz değişkendir ve Brusella antiserumu ile aglütinasyon vermez.						
<sup>b</sup> NA, uygulanmaz.						

Tablo 2. Brusella cinsinde tür ve biyotiplerin karakteristik ayırımı (1,11)							
Tür-Biyotip	Boyalı besiyerinde üreme					Monospesifik serumla agglütinasyon	
	CO <sub>2</sub> ihtiyacı	H <sub>2</sub> S oluşumu	Bazik Fuksin 1:100,000	Tionin 1:25,000	Tionin 1:100,000	B. abortus	B. mellitensis
<i>B.melitensis-1</i>	-	-	+	-	+	-	+
<i>B.melitensis-2</i>	-	-	+	-	+	+	-
<i>B.melitensis-3</i>	-	-	+	-	+	+	+
<i>B.abortus-1</i>	+/-	+	+	-	-	+	-
<i>B.abortus-2</i>	+	+	-	-	-	+	-
<i>B.abortus-3</i>	+/-	+	+	+	+	+	-
<i>B.abortus-4</i>	+/-	+	+	-	-	-	+
<i>B.abortus-5</i>	-	-	+	-	+	-	+
<i>B.abortus-6</i>	-	+/-	+	-	+	-	+
<i>B.abortus-7</i>	-	+/-	+	-	+	+	-
<i>B.abortus-8</i>	+	-	+	-	+	+	+
<i>B.abortus-9</i>	+/-	+	+	-	+	-	+
<i>B.suis-1</i>	-	+	-	+	+	+	-
<i>B.suis-2</i>	-	-	-	-	+	+	-
<i>B.suis-3</i>	-	-	+	+	+	+	-
<i>B.suis-4</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>B.neotomae</i>	-	+	-	-	+	+	-
<i>B.ovis</i>	+	-	+	+	+	-	-
<i>B.canis</i>	-	-	-	+	+	-	-

### 2.5.2. Serolojik testler

Brusellozun serolojik tanısı genellikle Wright aglütinasyon testi (WAT) ile yapılmaktadır. Brusella *in vitro* yavaş üreyen bir mikroorganizma olduğundan primer izolasyonu gecikebilir ve primer tanı serolojik testlerin sonucuna bağlı olarak konabilir. Bazı laboratuvarlarda eleme testi olarak Rose-Bengal plak testi uygulaması ardından pozitif olanlar WAT'ine alınmaktadır. Kompleman fiksasyon, indirekt Coombs ve RIA (Radio Immuno Assay), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) gibi yöntemler brusellozun serolojik tanısında uygulanmaktadır (2,20,21,22).

İnsan brusellozunda immün cevap IgM antikor titresindeki ilk artış ile karakterizedir. Bunu birkaç hafta içinde IgG sentezi izler. Tedavi sonrasında titreler yavaş yavaş düşmektedir. IgG titreleri IgM titrelerinden daha hızlı düşer. Bazı olgularda IgM antikorları enfeksiyonun sürdüğüne dair herhangi bir belirti olmaksızın serumda aylarca hatta yıllarca düşük titrede kalırlar. IgG titresindeki hızlı düşüş tedavi başarısını gösterirken titre artışı ya da titrede bir düşüş olmaması relapsı göstermektedir (20).

İmmünglobülin sınıflarını ayırmak için IgM antikorlarını disülfid bağlarını parçalayan basit bir yöntem kullanılmaktadır. 2-mercaptoethanol veya dithiothreitol gibi maddeler uygulanan serumda IgM molekülleri aglütinasyon aktivitelerini kaybederken IgG antikorları etkilenmemektedir. WAT total aglütinan antikorları (IgG ve IgM) belirler ve 2-mercaptoethanol veya dithiothreitol IgG antikorlarını belirler. Bu ayırım aktif enfeksiyonun belirlenmesinde önemlidir (20). WAT ile tek serum çalışmasında 1/160 ve üzeri titreler veya dört kat titre artışı anlamlı kabul edilmektedir (2).

Kronik brusellozda antikorlar blokan tipte olabilir ve bu inkomplet antikorlar serumda reaksiyon vermezler. Bunu belirleyebilmek için anti-insan gamma globülini (Coombs testi) kullanılır (5).



ELISA brusellozun tanısında WAT'inden daha duyarlı bir yöntemdir. Bazı çalışmalarda monoklonal antikorlar ile hazırlanan ELISA'nın brusellozun tanısında kan kültürlerine uygun alternatifler olduğu belirtilmektedir (22).

Son yıllarda brusellozun hızlı tanısında kemik iliği aspirasyonu ve periferik kan örnekleri ile polimeraz zincir reaksiyonu çalışmalarının çok olumlu sonuçlar verdiği bildirilmektedir (5). Araştırmacılar PZR'nun bruselloz tanısında son derece özgül bir yöntem olduğunu (23), 30 saniyeden kısa sürede tamamlanan Real-time-PZR bazlı LightCycler'ın, epidemiyolojik ve ekolojik çalışmalarda da duyarlılığı, özgüllüğü ve hızı ile dikkat çektiğini belirtmektedirler (24).

## 2.6. ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK VE TEDAVİ

Brusella türlerinin duyarlılık testleri genellikle istenmez. Brusella'nın *in vitro* duyarlılığını test edebilmek için standart yöntemler henüz geliştirilememiştir (2,25). Brusella'lara karşı antibiyotiklerin minimal inhibitör konsantrasyonlarını (MIC) belirlemede E test yönteminin mikrodilüsyon yönteminden daha pratik ve daha kısa sürede sonuç alınabilen bir yöntem olduğu bildirilmektedir (25). Bruselloz tedavisindeki başarısızlıkların çoğu ilaç direncine bağlı değildir. Bruselloz tedavisi uzun süreli kombine antibiyotik kullanımı gerektirir ve en az toksik, en etkili şema net olarak belirlenememiştir (2,7). Tetrasiklinler, aminoglikozitler, rifampisin ve trimetoprim-sulfametoksazol (TMP/SMZ) bruselloz tedavisinde uygulanmaktadır (2). Brusella'nın fakültatif intrasellüler bir mikroorganizma olması, ilaçların fagositler ve fagozomlar içine penetrasyonunda soruna yol açmakta ve bu yüzden konuyla ilgili çalışmalar en iyi deney hayvanları veya doku kültürlerinde yapılabilmektedir (7).

Brusellozda tedavi, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nünde önerdiği şekilde ikili, bazı durumlarda da üçlü kombine antibiyotik uygulanması şeklindedir. Bruselloz tedavisinde DSÖ 1981 yılında tetrasiklin+streptomisin (tetrasiklin: 2g/gün 6 hafta; streptomisin: 1g/gün 3 hafta); 1986 yılında ise doksisiklin + rifampisin (doksisiklin: 200 mg/gün; rifampisin 600-900 mg/gün 6'şar hafta) önermiştir (3).

Doksisiklin+rifampisin kombinasyonu ile doksisiklin+streptomisin kombinasyonunun karşılaştırıldığı çalışmalarda her iki rejimin de 45 gün süreyle uygulandığında eşdeğer etkinlikte olduğu belirlenmiş; ancak spondiliti olan hastalarda doksisiklin+streptomisin kombinasyonunun daha etkili olduğu bildirilmiştir. Laboratuvar çalışmalarından elde edilen sonuçlar; tedaviye bir aminoglikozit eklenmesinin, streptomisin ile minosiklin, rifampisin veya siprofloksasin kombinasyonunun, bu ilaçlardan herhangi birinin tek başına kullanımından çok daha etkili olduğunu göstermiştir (4).

Streptomisin kullanılan kombinasyonlarda streptomisine bağlı ototoksisite, rifampisin kullanılan kombinasyonlarda ise rifampisine bağlı hepatotoksisite açısından hastalar yakından takip edilmelidir.

Sekiz yaşın üzerindeki çocukların tedavisinde doksisiklin veya oksitetrasiklin'in gentamisin ile kombinasyonu; sekiz yaşın altındaki çocuklarda ise TMP/SMZ'un gentamisin ile kombinasyonu önerilmektedir (3).

Bruselloza bağlı menenjit, endokardit gibi komplikasyonların tedavisi özel durumlardır ve tedavide kullanılacak rejimler konusunda görüş birliği yoktur. Doksisiklin kan-beyin bariyerini, diğer tetrasiklinler ile karşılaştırıldığında daha iyi geçer ve TMP/SMZ veya rifampisin ile kombine edilerek brusella menenjit veya endokarditinde kullanılabilir (3).

Florokinoller hızlı bir şekilde bakteriyel hücre ölümüne yol açan bakteriyel DNA replikasyon ve transkripsiyonunu DNA girazı inhibe ederek sağlarlar. Florokinolonlardan olan levofloksasin'in dokulara penetrasyonu iyidir. Siprofloksasin ve diğer kinolonlarla karşılaştırıldığında, levofloksasin iyi tolere edilebilmesi, minimal yan etkisi ve oral veya parenteral yolla günlük tek doza izin veren farmakokinetik profili vardır (26). Brusellozun standart tedavi rejimi % 10 olguda önleneyemen relaps görülmesine rağmen tetrasiklin ve streptomisin kombinasyonudur. Bir tetrasiklin olan doksisiklin ve rifampisin kombinasyonu sadece % 8.4 relaps oranı ile en etkili kombinasyondur (7).

## 2.7. EPİDEMİYOLOJİ VE KORUNMA

Bruselloz morbiditesi oldukça yüksek olmasına karşın mortalitesi düşük olan bir infeksiyon hastalığıdır. Ülkemizde ilk defa 1915 yılında Kuleli hastanesinde bir erde Kural ve Akalın tarafından *B. melitensis*, sığırdan 1931 yılında Berke; koyun ve keçilerden 1943'de Golem, 1944'de Köylüoğlu ve Aktan Brusella cinsi bakterileri bulmuşlardır (5).

İnsanlar arasında brusellozun belirli bir bölgeye yayılması, o yöredeki hayvancılık ile yakından ilişkilidir. Bir ülkede hangi hayvan türü fazla ise insanlar arasında da o tipin infeksiyonu çoğunluktadır. 1982-1986 yılları arasında Türkiye'nin bazı illerinde yapılan bruselloz olguları çalışmasında odağın, en fazla koyun ve keçi popülasyonuna sahip olan Konya ilinde olduğu görülmüştür (5). Bruselloz hayvancılığın yaygın olduğu Ankara ovasında, Güneydoğu Anadolu' da Diyarbakır, Erzincan ve Urfa yörelerinde endemiktir (3). Olguların çoğu yaz aylarında olmaktadır. Akut infeksiyon genellikle bu aylarda görülmektedir. Bunun süt ve süt ürünlerinden ileri gelebileceği ve yaz aylarında kişilerin seyahat nedeniyle hijyen koşullarına uygun olmayan süt ve benzeri yiyecekleri tüketmeleridir (5).

Brusella cinsi bakterilerin oluşturduğu hastalıklar özellikle Akdeniz bölgesi, Arap yarımadası, Hindistan yarımadası, Orta ve Güney Amerika ve Meksika'nın bazı bölgelerinde yaygındır (1,4).

İnsanların brusellozdan korunması; evcil hayvanlarda brusellozun kontrolü ve eradikasyonuna bağlıdır. Bu açıdan veteriner hekimlerin doktorlarla işbirliği halinde çalışması önem taşır. Brusella bakterisi ile infekte olmamış süt danaları *B. abortus* 19 suşu, süt kuzuları *B. melitensis* Rev1 suşu aşısı ile aşılanır. Bu aşılar canlı attenüe aşılardır (3,11). Özellikle kırsal kesimde yaşayan halkın bruselloz yönünden bilinçlendirilerek, çiğ süttten peynir ve yağ yapımı önlenmelidir. Sütün pastörize edilerek tüketilmesi önerilir. Hastalığın temas yoluyla bulaşını önlemek için; mezbaha işçileri, veterinerler, hayvan sağlık memurları, hayvan bakıcıları ve et paketleyicilerinin, hayvan ürünleri ve hayvanların atıkları ile temas etmemeleri ve çalışırken eldiven giymeleri önerilmektedir (3).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve laboratuvarlarında Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel Araştırma Merkezinde yapıldı.

#### 3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

**Brusella selektif agar:** Kırkiki gram brusella agar 1000 mL distile suda eritilerek hazırlanan besiyeri 15 dakika bir buçuk atmosfer basınç altında 121°C'da otoklavda steril edildi. Soğutulan (50°C) besiyerine %5 oranında kan ve diğer bakterilerin üremesini önlemek için polimiksin B 5000 IU, basitrasin 25000 IU, nistatin 10000 IU, sikloheksimid 100 mg, nalidiksik asit 5 mg ve vankomisin 20 mg eklendi.

**Gliserol dekstroz agar:** Hazırlanıp otoklavlanmış kanlı agar bazı (Blood agar base No:2 Oxoid) 56°C'a soğutulup içerisine son konsantrasyonu %2

olacak şekilde gliserol solüsyonu ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde steril D-glukoz solüsyonu eklendi.

### 3.2. BAKTERİ SUŞUNUN SEÇİMİ

Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvar'ında infektif endokarditli bir hastadan izole edilen ve *Brusella melitensis* biyovar-3 tiplmesi yapılan laboratuvar suşu çalışma için seçildi. Bu suş; kanlı agarda ikinci günde üreyen, hemolizsiz, pigmentsiz, düzgün kenarlı, konveks ve nemli parlak koloniler oluşturan ve Gram negatif küçük kokobasil görünümünde bakterilerdi. Bu brusella türü laboratuvar suşu, bruselloz geçiren bir kişinin serumu ile lam aglütinasyonu yapılarak doğrulandı.

Seçilen brusella suşu gliserol dextroz agara pasaj edildi. Üreyen bakterilerin S tipi koloni yapıp yapmadığını belirlemek için beş günlük 37° C'da inkübasyonu takiben oluşan kolonilerin üzerine amonyum oksalat- kristal viyole boyası döküldü. Üstten oblik aydınlatma yapıp sarı röfle veren S tipi koloniler alınarak ileri çalışmalar için bu bakteriler Brusella agara (Oxoid) pasaj yapılarak çoğaltıldı.

Amonyum oksalat-kristal viyole boyasının hazırlanışı

1. Kristal viyole stok solüsyonu

Kristal viyole (%90-95)	40g
Etanol (%95)	400mL

(Karışım hazırlanarak cam şişede, oda sıcaklığında bir yıl saklanabilir).

2. Amonyum oksalat solüsyonu (%1)

Amonyum oksalat	16g
Distile su	1,600mL

(Karışım koyu renkli şişede hazırlanır, oda sıcaklığında bir yıl saklanabilir).

Amonyum oksalat-kristal viyole çalışma boyasının hazırlanışı

Kristal viyole stok solüsyonu	40mL
Amonyum oksalat solüsyonu	160mL

(Cam şişeye filtre edilerek boya hazırlanır ve kullanılır) (27).

### **3.3. DENEY HAYVANLARI**

Çalışma, her birinin ağırlığı 20-45 (37±5,6g) gram arasında değişen toplam 59 adet BALB/c beyaz deney faresinde yapıldı. Deney fareleri, Konya Veteriner Kontrol Araştırma Laboratuvarı ve Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel Araştırma Laboratuvar'ından alındı. Farelerin bakımı Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Temizlik, yiyecek ve içecekleri günlük olarak sağlandı.

#### **3.3.1. Deney hayvanlarına bakteri inokülasyonu**

Brusella agarda üretilen brusella bakteri kolonileri  $8 \times 10^4$  bakteri/mL olacak şekilde serum fizyolojik ile süspanse edildi. Bakteri süspanسیونundan her bir fareye 0.5 mL intraperitoneal yolla insülin enjektörü ile verildi. Brusella bakterisi verilen deney hayvanlarında kronik brusella infeksiyonunun oluşması için otuz gün süreyle kafeslerinde bekletildi.

### **3.4. ANTİBİYOTİKLER VE UYGULAMA YOLLARI**

Antibioterapide öngörülen antibiyotikler deney hayvanlarının bir grubuna oral ve diğer gruplara parenteral yolla aseptik koşullarda insülin enjektörü ile verildi. Levofloksasin (Tavanic 100 mL i.v infüzyon seti, Hoecht Marion Russel) parenteral olarak uygulandı. Her gün için kullanılacak miktar belirlenerek, uygulamanın yapılacağı zamana kadar steril tüplerde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'da saklandı.

Doksisiklin (Fako İlaçları A.Ş.) oral yolla uygulandı. Toz halindeki etken madde steril distile su içinde eritildi. Hazırlanan stok solüsyondan her gün kullanılacak miktar belirlenerek uygulamanın yapılacağı zamana kadar steril tüplerde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'da saklandı.

Uygulanan antibiyotiklerin etkinliğinin belirlenmesi için deney hayvanları dört gruba ayrıldı. Onaltı fareden oluşan birinci gruba (A grubu) 50 mg/kg/gün levofloksasin 20 gün i.p, Onyeddi fareden oluşan ikinci gruba (B grubu) 50 mg/kg/gün levofloksasin 30 gün i.p ve onüç fareden oluşan üçüncü gruba (C grubu) 50 mg/kg/gün doksisisiklin 30 gün oral gavaj yoluyla verildi. On fareden oluşan kontrol grubuna (D grubu) ise herhangi bir tedavi verilmedi.

### 3.5. DALAK KÜLTÜRLERİNİN HAZIRLANIŞI

Hayvanlarda brusella infeksiyonunun varlığının belirlenmesi için bakteri inokülasyonundan 20 gün sonra deney hayvanlarından üç tanesi rastgele seçildi ve anestezi altında (ketamin 100 mg/kg) aseptik koşullarda dalakları alınarak ayrı ayrı 1 mL steril serum fizyolojik içinde homojenizatör ile homojen hale getirildi. Her bir homojenat üç brusella agar plağına ekilerek 37 °C'da 5-7 gün inkübe edildi. Üreyen kolonilerden gram boyama yapıldı ve verilen bakteri ile aynı bakteri olup olmadığı incelendi.

Yirmi günlük tedavi sonunda onaltı fareden oluşan A grubundaki deney hayvanları ketamin anestezisiyle sakrifiye edildi. Deney hayvanlarının aseptik koşullarda çıkarılan dalakları tartıldı ve 1 ml steril SF içinde homojenatörde homojen hale getirilip homojenatın 0.1 mL' sinin 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 dilüsyonları yapıldı ve her biri üç ayrı brusella agara ekildi. Kültürler üreme açısından ikinci günden itibaren kontrol edildi. Yedi gün sonunda koloniler sayıldı. Her bir dilüsyon için üç plağın ortalaması alınıp 1 mL'deki koloni sayısı hesaplandı. Koloni sayımında 30-300 koloni bulunan plaklar değerlendirilmeye alındı (28).

B, C ve D gruplarındaki fareler 30 gün sonunda ketamin anestezisiyle sacriye edildi. Aseptik koşullarda çıkarılan dalakları tartıldı ve 1 mL steril SF içinde homojenize edildi. Homojenatın 0.1 mL'sinin 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 dilüsyonları yapıldı ve her bir homojenat üç ayrı Brusella agara ekildi. İkinci günden sonra üreme kontrolü yapıldı. Koloniler yedi gün sonunda sayıldı. Dilüsyona ait üç plağın ortalaması alınarak 1 mL homojenattaki koloni sayısı hesaplandı.

### **3.6. ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİN ÖLÇÜLMESİ (E-TEST)**

MIC tayini için E-test (AB biodisk- Sweden) stripleri kullanıldı. Bakteri suşundan iki ml steril serum fizyolojik içine 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri inoküle edildi. Bu inokülasyon brusella agarlara eşit oranda pamuklu silgeç ile yayıldı. Daha sonra her bir petriye bir adet E-test sribi konuldu ve 37 C'de 3 gün inkübe edilerek MIC değerleri striplere bakılarak hesaplandı.

### **3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Tedavi protokolü farklı uygulanan deney hayvanı grupları arasında farkın olup olmadığı ve dalak ağırlıkları ile antibakteriyel tedavide başarı arasındaki ilişki SPSS programında Kruskal Wallis Varyant Analizi Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Tedavi protokolü uygulanan gruplar arasında fark olup olmadığı Ki Kare testi ile araştırıldı (29).



## **4. BULGULAR**

İntraperitoneal yolla S tipi koloni yapan brusella laboratuvar suşu verilen deney farelerinin 30'u erkek 29'u dişi idi. Bakteri verilen deney farelerinden 3 tanesi bakteri inokülasyonundan 20 gün sonra rastgele seçilip ketamin anestezisiyle sakrifiye edildi. Steril ortamlarda çıkarılan dalakları bir mL steril SF içine konup homojenizatörde homojenize edildi. Her bir süspansiyon üç ayrı brusella agara ekildi ve 37°C' de 5-7 gün inkübe edildi. Üreyen kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram boyası ile boyandı ve anti-serumuyla karşılaştırıldı ve verilen brusella bakterisi ile aynı olduğu görüldü ve tüm farelerde sistemik infeksiyon oluştuğu belirlendi.

### **4.1. BRUSELLA İLE İNFEKTE EDİLEN FARELERİN ANTİBAKTERİYEL TEDAVİ BULGULARI**

Brusella bakterileri ile infekte edilen 56 deney faresi dört gruba ayrıldı. Onaltı fareden oluşan A grubuna 50 mg/kg/gün levofloksasin 20 gün i.p, on yedi fareden oluşan B grubuna 50 mg/kg/gün levofloksasin 30 gün i.p ve on üç fareden oluşan C grubuna 50 mg/kg/gün doksisisiklin 30 gün oral gavaj yoluyla verildi. On

fareden oluşan kontrol grubuna ise herhangi bir tedavi verilmedi. Tedavi sonrası fareler sakrifiye edildi ve dalakları çıkarılarak SF içinde aseptik koşullarda homojenatları hazırlandı. Bu homojenatların brusella agarda kültürleri yapıldı ve inkübasyon sonrası bakteri kolonileri sayıldı. A grubunda ortalama koloni sayısı  $1.03 \times 10^6$  ( $3.5 \times 10^5$ - $2.4 \times 10^6$ ), B grubunda ortalama koloni sayısı  $4 \times 10^5$  ( $0$ - $1.8 \times 10^6$ ), C grubunda ortalama koloni sayısı  $0$  ( $0$ - $4.2 \times 10^3$ ), D grubunda ortalama koloni sayısı  $2.4 \times 10^6$  ( $1.1 \times 10^6$ - $5.2 \times 10^6$ ) idi. Kontrol grubunun dışında en yüksek koloni sayısı ortalaması A grubunda gözlemlendi. Tedavi protokolü farklı olan bu grupların dalak homojenatlarından üreyen bakteri koloni sayıları yönünden herbir grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.001$ ).

**Tablo 3.** Tedavi sonrası üreyen brusella bakteri koloni sayıları

Gruplar	Deney Hayvanı Sayısı (n)	Koloni Sayısı Ortalaması	Minimum-Maksimum
A	16	$1.03 \times 10^6$	$3.5 \times 10^5$ - $2.4 \times 10^6$
B	17	$4 \times 10^5$	$0$ - $1.8 \times 10^6$
C	13	0	$0$ - $4.2 \times 10^3$
D	10	$2.4 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$ - $5.2 \times 10^6$

Kruskal Wallis Varyant Analizi Mann Whitney U testi  $X^2= 41.22$   $p < 0.001$

Levofloksasin tedavisi verilen B grubu 17 fareden 2 tanesinde (%11.8) doksisiklin tedavisi verilen C grubu 13 fareden 11 tanesinde (%84.6) iyileşme görüldü. İyileşen farelerin dalak kültürlerinde üreme olmadı (koloni sayısı:0) (Tablo 3). Levofloksasin tedavisi verilen A grubu farelerden 16'sında da (16/16:%100.0), B grubu 17 fareden 15'inde (15/17:%88.2), doksisiklin tedavisi verilen C grubu 13 farenin 2'sinde (2/13:%15.4) ve herhangi bir tedavi verilmeyen D grubu 10 farenin 10'unda (10/10:%100) iyileşme olmadı. Levofloksasin'in sağılımdaki başarı oranları karşılaştırıldığında, hiçbir farenin iyileşmediği A grubu ve 2 farenin iyileştiği B grubu ile tedavi verilmeyen D grubu arasındaki fark

istatistiksel olarak fark anlamsız bulundu ( $p>0.05$ ). Doksisisiklin verilen C grubunda tedavi başarısı ise istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p<0.05$ ).

**Tablo 4.** Brusella bakterileri ile infekte edilen farelerin antibakteriyel tedavi bulguları

Gruplar	İyileşen		İyileşmeyen		Toplam	
	sayı	%	sayı	%	sayı	%
A	0	0.0	16	100.0	16	100.0
B	2	11.8	15	88.2	17	100.0
C	11	84.6*	2	15.4	13	100.0
D	0	0.0	10	0.0	10	100.0
Toplam	13	23.2	43	76.8	56	100.0

\*  $X^2= 36.61$   $p<0.05$

## 4.2. İNFEKSİYON DALAK AĞIRLIĞI İLİŞKİSİ

İnfekte edilen ve antibakteriyel tedavi protokolü uygulanan farelerin dalak ağırlıklarının değişip değişmediğini belirlemek için her bir grup içinde yer alan farelerin dalak ağırlıkları ölçüldü ve herbir grubun ortalaması belirlendi. A grubunda ortalama dalak ağırlığı 0.40 g (0.15-0.71 g), B grubunda ortalama dalak ağırlığı 0.37 g (0.11-0.59 g), C grubunda ortalama dalak ağırlığı 0.23 g (0.11-0.42 g) ve D grubunda ortalama dalak ağırlığı ise 0.56 g (0.42-0.98 g) idi. A grubu ile B grubunun dalak ağırlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ( $p>0.05$ ). A ile C grubunun, A ile D grubunun, B ile C grubunun, B ile D grubunun ve C ile D grubunun dalak ağırlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p<0.001$ ).

**Tablo 5.** Brusella bakterileri ile infekte edilen ve antibakteriyel tedavi edilen farklı grupların dalak ağırlıkları ortalamaları

Gruplar	Deney Hayvanı Sayısı (n)	Dalak ağırlıkları ortalaması (gram)	Maksimum-Minimum (gram)
A	16	0.40	0.15-0.71
B	17	0.37	0.11-0.59
C	13	0.23	0.11-0.42

D	10	0.56	0.42-0.98
---	----	------	-----------

Kruskal Wallis Varyant Analizi Mann Whitney U testi  $X^2= 24.45$   $p< 0.001$

### **4.3. MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYON BULGULARI**

Bu çalışmada kullanılan Brusella laboratuvar suşunun MIC duyarlılığı E test yöntemi ile belirlendi. Levofloksasin'in MIC değeri 0.032  $\mu\text{g/mL}$  olarak bulundu. Doksisisiklin'in MIC değeri çalışılmadı.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bruselloz dünya genelinde, özellikle Akdeniz ülkeleri ve bazı gelişmekte olan ülkelerde, bir halk sağlığı problemi olmayı sürdürmektedir. Brusella cinsi bakteriler intrasellüler bakteri grubundadır. Bu durum hastalığın uzun süreli seyrine yüksek relaps insidansını ve ayrıca mikroorganizmanın terapötik ajanlar ile dokulardan eradikasyonunun güçlüğüne neden olmaktadır (30,31,32,33,34). Tedavide, günümüzde en sık olarak doksisisiklin ile streptomisin kombinasyonu uygulanmaktadır (19,30,32).

Brusella cinsi bakterilerin antibiyotiklere karşı *in vitro* olarak duyarlılıkları ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Trujillano-Martin ve ark (6)'nın brusella bakterileri üzerinde yaptıkları çalışmada levofloksasinin MIC değerini 0.5 µg/mL ve trovafloksasinin MIC değerini 1 µg/mL, Domingo ve ark (31) ise azitromisinin MIC değerini 2 mg/L olarak bulmuşlardır. Garcia-Rodriguez ve ark (35) tarafından yapılan benzer çalışmada klaritromisin'in MIC değerini 8 µg/mL ve azitromisinin MIC değerini 2 µg/mL, Landinez R ve ark (36) azitromisinin MIC değerini 0.5-1.0 µg/mL olarak bildirmişlerdir. Lang ve ark (37) ise kinolon grubu antibiyotiklerin brusellozun tedavisinde tek başına uygulanmasının uygun olmadığını, ancak streptomisin veya rifampisin veya doksisisiklin ile birlikte uygulanmasının uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde de benzer araştırmalar yapılmıştır. Akova ve ark (38) azitromisinin MIC değerini 1 µg/mL, Demirdağ ve ark (33) ise Klaritromisin'in MIC değerini 4 µg/mL olarak bulmuşlardır.

Bölgemizde de *B. melitensis* ile yapılan çalışmalar vardır. Sümerkan ve ark (39), laboratuvarlarında izole edilen brusella suşlarına ait antibakteriyel duyarlılıklarını inceleyerek kinolon grubundan siprofloksasin, ofloksasin, pefloksasin, norfloksasinin MIC<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 0.5, 1, 4 ve 4 mg/L; sefalosporinlerden seftizoksım, seftriakson, sefotaksim ve sefuroksime ait MIC<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 0.25, 1, 2, 32 mg/L; diğer antibiyotiklerden tetrasiklin, doksisisiklin, streptomisin, rifampisin, trimetoprim/sülfometaksazol ve eritromisine ait MIC<sub>90</sub> değerleri sırasıyla 0.5, 0.5, 2, 4, 4, 32 mg/L olarak belirlemişlerdir. Evrensel ve ark (40) 42 *B. melitensis* suşunda doksisisiklin-siprofloksasin, siprofloksasin-rifampisin, doksisisiklin-rifampisin, rifampisin-azitromisin, doksisisiklin-azitromisin kombinasyonlarını *in vitro* olarak değerlendirmiş ve doksisisiklin-azitromisin kombinasyonunda %33, rifampisin-azitromisin kombinasyonunda %29 ve doksisisiklin-rifampisin kombinasyonunda %12 sinerji olduğunu, doksisisiklin-siprofloksasin ve siprofloksasin-rifampisin kombinasyonlarında sinerji olmadığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda, levofloksasinin E-test yöntemi ile MIC değeri 0.032 µg/mL olarak belirlendi. Bu bulgular dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, çalışmada kullanılan brusella suşunun *in vitro* duyarlılıklarının genelde birbirine benzediği görölmektedir.

Shasha ve ark (41) akut deneysel fare bruselloz modelinde Rifampisin ve Doksisisiklin'i oral ve i.p yolla uyguladıkları çalışmada kür sağlamışlar, fakat siprofloksasin, oflofloksasin ve peflofloksasin ile ise başarı sağlayamamışlardır. Lang ve ark (42) akut brusellozda hastalara günde iki kez verdikleri Siprofloksasin ile tedavide başarılı olamamışlardır. Shasha ve ark (43)'nın yaptıkları başka bir *in vivo* alışmada rifampisin'in deneysel fare brusellozunda doksisisiklinden çok daha iyi sonuçlar verdiğini, hatta çeşitli dozlarda kullanılan doksisisiklin ile rifampisin

kombinasyonunun rifampisininin yalnız başına kullanımı ile benzer sonuçlar gösterdiğini bildirmişlerdir. Lang ve ark (44) siprofloksasinin tek başına veya streptomisin ile kombinasyonunun akut bruselloz tedavisinde yeterli olmadığını; Doksisisiklin-streptomisin ve rifampisin-sterptomisin tedavi rejimlerinin ise sinerjistik etkili ve bruselloz tedavisinde son derece avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde yapılan akut deneysel fare brusellozu çalışmalarında; Demirbağ ve ark (33) ampicilin ve seftriaksonu sağılımda etkin bulmazken, rifampisin ile % 100 kür sağlandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, klaritromisinin 30 mg/kg/gün'lük dozda kısmen etkili olup bu etkinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir. Felek ve ark (45) yaptıkları çalışmada insan brusellozunda eritromisinin alternatif bir seçenek olabileceğine dikkat çekerek özellikle çocuklarda ve gebe kadınlarda avantaj sağlayabileceğini bildirmişlerdir. Felek ve ark (46)'nın akut fare brusellozu üzerinde yaptıkları bir diğer çalışmada, 50 mg/kg/gün dozda oral rifampisin ile bütün farelerde bakteriyolojik kür sağlandığını, azitromisinin ümit verici olduğunu ve azitromisinin özellikle çocuklarda ve gebelerde avantaj sağlayabileceğini vurgulamışlardır.

Kronik fare brusellozunda uygulanan azitromisinin 50 mg/kg dozda infeksiyonu önemli ölçüde azalttığı, doksisisiklinin aynı dozda uzun süreli veya doksisisiklin-sterptomisin kombinasyonu uygulamasının daha etkin olduğu bildirilmektedir. Brusella türlerine karşı doksisisiklinin lipofilik olması, nötral ve asit çevredeki biyoaktivitesi ile insan bruselloz tedavisi için halen en iyi seçenek olduğuda vurgulanmaktadır (31). Domingo ve ark (30) tarafından yapılan bir çalışmada *B. melitensis* ile infekte dişi Balb/C farelerinde doksisisiklin ve streptomisin tedavisinin humoral immün cevap üzerine etkinliği araştırılmış, yalnız doksisisiklin (50 mg/kg/12 saat) 45 gün veya streptomisin (10 mg/kg/12 saat) ile kombinasyonun 14 gün uygulama sonucunda infeksiyonun şiddetinde önemli ölçüde azalma sağladığı ve özgül IgG düzeyinde artma olduğu gösterilmiştir. Kırk beş gün uygulanan doksisisiklin bütün hayvanlarda 78. günde kür sağlamıştır. *B. melitensis* ile infekte farelerde azitromisin ve doksisisiklin-streptomisin kombinasyonunun terapötik rejim

aktivitesi karşılaştırılmış ve kronik modelde azitromisin 50 mg/kg/gün dozda ard arda 10, 14 veya 21 günde infeksiyonda önemli bir azalma kaydedilmiştir. Bununla beraber doksisisiklin (50 mg/kg/12 saat 21 gün) azitromisinden daha etkili bulunmuştur (32).

Çalışmamızda dört grupta incelenen kronik fare bruselloz modelinde A grubuna 50 mg/kg/gün levofloksasin 20 gün i.p, B grubuna 50 mg/kg/gün levofloksasin 30 gün i.p ve C grubuna 50 mg/kg/gün doksisisiklin oral gavaj yoluyla verildi. Kontrol D grubuna tedavi verilmedi. Tedavi sonrası fare dalaklarından yapılan bakteriyolojik kültürlerde kontrol grubu dışında en yüksek koloni sayısı ortalaması A grubunda ve kısmen B grubunda gözlemlendi (Tablo 3). Levofloksasin verilen A ve B grubu infekte farelerde tedavide başarı sağlanamazken, doksisisiklin verilen C grubunda başarı sağlandığı görüldü. Uygulanan antibakteriyellerde doksisisiklin ile tedavi yapılan grupta elde edilen başarı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ , Tablo.4). Doksisisiklin ile tedavide başarı oranları Domingo ve ark (30,31,32)'lerinin yaptıkları çalışmalar ile uyumlu idi.

Brusella ile infekte fare dalak ağırlıkları ortalaması incelendiğinde A grubu ile B grubunun dalak ağırlıkları arasında fark yoktu ( $p>0.05$ ). Ancak A ile C grubunun, A ile D grubunun, B ile C grubunun, B ile D grubunun ve C ile D grubunun dalak ağırlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p<0.001$ , Tablo 5). Bu durum, intrasellüler bir bakteri olan brusella cinsi bakteriler ile infekte edilen farelerin dalak ağırlıklarını arttırdığını göstermektedir. A ve B grubundaki infekte farelerde tedavi sağlanamadığı için, dalak ağırlıkları genelde birbirine eşit olup C grubuna kıyasla yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Tedavide tam başarı sağlanan C grubundaki farelerin dalak ağırlıkları azalmıştır. Bu gözlem doğrultusunda herhangi bir kaynak bulunamadı.

Brusellozun tedavisinde levofloksasin *in vitro* olarak etkili (MIC 0.032 µg/mL) olduğu halde, *in vivo* olarak etkisiz bulunması bir çelişkidir. Bu çalışma, levofloksasin veya diğer yeni antibiyotiklerin yalnız *in vitro* etkinliği dikkate alınarak klinik uygulamaya geçilmemesi gerektiğini göstermektedir. Laboratuvar



çalışmalarında kombinasyon çalışmalarının yapılması, *in vitro* etkinliğin *in vivo* olarak hayvan modelleri ile korelasyonuna bakılması ve buna önem verilmesi klinikteki başarıyı yükseltecektir. Sonuç olarak, bu çalışma, insan bruselloz tedavisinde doksisisiklinin en iyi seçeneklerden biri olarak bildirildiği gibi (31,32), doksisisiklinin fare bruselloz modelinde de başarı sağladığını, ancak levofloksasinin bu modelde başarısız olduğunu göstermektedir.

## ÖZET

### **Deneyisel fare bruselloz modelinde doksisisiklin ve levofloksasinin etkilerinin karşılaştırılması**

Dünya genelinde bir halk sağlığı problemi olmayı sürdüren brusellozun etkeni, intrasellüler patojenler grubunda yer alan ve yüksek sıklıkla relaps yapabilen bir bakteridir.

Bu çalışmada, bruselloz tedavisinde etkinliği kanıtlanmış olan doksisisiklin ile henüz etkinliği konusunda yeterli araştırma yapılmamış olan levofloksasinin *in vivo* olarak *Brucella spp.* laboratuvar suşuna etkinlikleri karşılaştırıldı. Her birinin ağırlığı 20-45 gram arasında değişen toplam 59 adet BALB/c beyaz deney faresine *Brucella spp.* laboratuvar suşu intraperitoneal yolla verildi ve kronik bruselloz oluşması için 30 gün kafeslerinde ortamda bekletildi. Uygulanan antibiyotiklerin etkinliğinin belirlenmesi için deney hayvanları dört gruba ayrıldı. Onaltı fareden oluşan birinci gruba (A grubu) 50 mg/kg/gün levofloksasin 20 gün i.p, 17 fareden oluşan ikinci gruba (B grubu) 50 mg/kg/gün levofloksasin 30 gün i.p, 13 fareden oluşan üçüncü gruba (C grubu) 50 mg/kg/gün doksisisiklin 30 gün oral gavaj yolu ile verildi. On fareden oluşan kontrol grubuna (D grubu) ise herhangi bir tedavi verilmedi. Tedavi süresi sonunda, levofloksasin uygulanan A ve B gruplarında iyileşmeyen fare sayısı sırasıyla 16 ve 15 iken, doksisisiklin uygulanan D grubunda 2 idi. Tedavi sonrası farelerin dalak kültürlerinde üreyen koloni sayılarının ortalaması; kontrol grubunun dışında en yüksek A grubunda olduğu belirlendi. Tedavi etkinliği yönünden levofloksasin ve doksisisiklin uygulanan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ). Doksisisiklin ile tedavi edilen farelerin dalak ağırlıklarının azaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak; levofloksasin deneyisel fare modeli brusellozun tedavisinde yetersiz iken, bu modelde doksisisiklinin etkin bulundu.

Anahtar kelimeler: fare brusellozu, tedavi, doksisisiklin, levofloksasin.

## SUMMARY

### **Comparison of the efficacy of doxycycline and levofloxacin in the experimental murine brucellosis model**

Brucellosis, which continues to be a worldwide public health problem, is a bacterium in the group of intracellular pathogens which can relapse with a high incidence.

In this study, the efficacy of doxycycline the effect of which against brucellosis is well known, and that of levofloxacin, the efficacy of which against brucellosis has not been studied thoroughly in the treatment of brucellosis were compared. A total of 59 Balb/c mice with body weight of 20-45 g were used. *Brucella spp.* laboratory strain was given to the mice intraperitoneally, and they were kept in their cage aseptically, in order to form chronic brucellosis for 30 days. In order to detect the efficacy of applied antibiotics mice were divided into four groups. The first group (Group A), consisting of 16, were treated with levofloxacin (50 mg/kg/day) for 20 days intraperitoneally, the second group (Group B) consisting of 17 mice were treated with levofloxacin (50 mg/kg/day) for 30 days, the third group (Group C) consisting of 13 mice were treated with doxycycline (50 mg/kg/day) for 30 days orally. And no therapy was applied to group D, the 10 mice consisting control group. At the end of the treatment period, the number of the mice which did not recover, in the levofloxacin-treated group A and B were 16 and 15 respectively, and in the doxycycline-treated group were 2. The mean value of the colonies produced in the spleen of the mice after treatment was determined to be the highest in group A, except for control group. The difference of treatment between the groups receiving levofloxacin and doxycycline was found statistically significant ( $p < 0.001$ ). It was observed that the spleen weight of the mice in the doxycycline group was reduced after the treatment.

In conclusion, levofloxacin was inefficient in the treatment of the experimental murine brucellosis model, whereas doxycycline was effective.

Key words: murine brucellosis, therapy, doxycycline, levofloxacin.

## 8. KAYNAKLAR

1. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. Brucella. In: Joklik Wk, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM (eds), Zinsser Microbiology (20<sup>th</sup> ed). Appleton & Lange, Connecticut 1992, pp 609-614.
2. Shapiro DS, Wong JD. Brucella. In: Murray PR, Baron EJO, Pfler MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), Manual of Clinical Microbiology (7<sup>th</sup> ed). American Society for Microbiology, Washington DC 1999, pp 625-631.
3. Sözen TH. Bruselloz. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (ed'ler), İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1996, ss 486-491.
4. Young EJ. Brucella species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases (4<sup>th</sup> ed). Churchill Livingstone, New York 1995, pp 2053-2060.
5. Baysal B. Brucella. Ustaçelebi Ş (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 1999, ss 571-577.
6. Trujillano-Martin I, Garcia-Sanchez E, Martinez IM, et al. In vitro activities of six new fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(1):194-195.
7. Hall WH. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. Rev Infect Dis 1990;12(6):1060-1093.

8. Corbel MJ. Brucella. In: Parker MT, Collier LH (eds), Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity Vol 2 (8<sup>th</sup> ed). Edward Arnold, London 1990, pp341-351.
9. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Genus Brucella. In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (eds), Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology ( 9<sup>th</sup> ed). Mosby, Baltimore 1994, pp 408-409.
10. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ. Genus Brucella. In: Krieg NR, Holt JG (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1). Williams & Wilkins, Baltimore 1984, pp 377-388.
11. Akan E. Brucella'lar. Tıbbi Mikrobiyoloji. Saray Tıp Kitabevleri, İzmir 1993, ss 147-155.
12. Bilgehan H. Brucella. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir 1990, ss155-160.
13. Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. J Clin Microbiol 1999; 37 (11):3437-3442.
14. Fiori LF, Mastrandrea S, Rappelli P, et al. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. J Clin Microbiol 2000;38(5):2005-2006.
15. Gamazo C, Vitas AI, Lopez-Goni I, et al. Factors affecting detection of *Brucella melitensis* by Bactec NR730, a nonradiometric system for hemocultures. J Clin Microbiol 1993;31(12):3200-3203
16. Kolman S, Maayan MC, Gotesman G, et al. Comparison of the Bactec and lysis concentration methods for recovery of *Brucella* species from clinical specimens. Eur J Clin Infect Dis 1991;10(8):647-648.



25. Gür D, Unal S. Comparison of E Test to microdilution for determining *invitro* activities of antibiotics against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(9):2337.
26. Wimer SM, Schoonover L, Garrison MW. Levofloxacin: A therapeutic review. *Clinical Therapeutics* 1998;20(6):1049-1070.
27. Kruczak-Filipov P, Shively RG. Gram stain procedure. In: Isenberg HD (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology, Washington DC 1992, pp1.5.
28. Isenberg HD. Antimicrobial susceptibility testing. In: Isenberg HD (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook Vol 1*, American Society for Microbiology Washington DC 1992, pp 5.16-5.17.
29. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. *Biyoistatistik* (3. Baskı). Hatipoğlu Yayınevi, Ankara 1990, ss 125-130.
30. Domingo S, Diaz R, Gamazo C. Antibiotic treatment induces an increase of the specific antibody levels in *Brucella melitensis* infected mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1995;12:91-96.
31. Domingo S, Gastearna I, Viyas AI, et al. Comparative activity azithromycin and doxycycline against *Brucella* spp. infection in mice. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:647-656.
32. Domingo S, Gamazo C. Inadequate azitromisin activity against *Brucella melitensis* in mice with acute or choronic infections. *J Chemother* 1996;8(1):55-58

33. Demirbağ K, Felek S, Kalkan A ve ark. Deneysel fare brusellozunun sağaltımında ampisilin, seftriakson, klaritromisin ve rifampisin etkinliği. *Ankem Derg* 1999;13(1):21-28.
34. Domingo S, Diaz R, Gamazo C. Significance of environmental conditions (pH and serum) on the *in vitro* potency of azithromycin against *Brucella melitensis*. *J Chemother* 1995;7(4):29-31.
35. Garcia-Rodriguez JA, Bellido LM, Fresnadillo MJ, et al. In vitro activities of new macrolides and rifapentine against *Brucella spp.* *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(4):911-913.
36. Landinez R, Linares J, Loza E, et al. In vitro activities of azithromycin and tetracycline against 358 clinical isolates of *Brucella melitensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:265-267.
37. Lang R, Rubinstein E. Quinolones for the treatment of brucellosis. *J Antimicrob Agents Chemother* 1992;29:357-363.
38. Akova M, Gür D, Livermore DM, et al. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(5):1298-1300.
39. Sümerkan B, Doğanay M, Bakışkan V ve ark. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Brucella melitensis*. *Doğa-Tr J of Medical Sciences, TÜBİTAK* 1993;18:17-22.
40. Evrensel N, Sümerkan B. In vitro activity of antibiotics and combinations against *Brucella melitensis*. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:503-506.



41. Shasha B, Lang R, Rubinstein E. Therapy of experimental murine brucellosis with streptomycin, co-trimoxazole, ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, doxycycline, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(5):973-976.
42. Lang R, Raz R, Sacks T, et al. Failure of prolonged treatment with ciprofloxacin in acute infections due to *Brucella melitensis*. *J Antimicrob Chemother* 1990;26:841-846.
43. Shasha B, Lang R, Rubinstein E. Efficacy of combination of doxycycline, and rifampin in the therapy of experimental mouse brucellosis. *J Antimicrob Agents Chemother* 1994;33:545-551.
44. Lang R, Shasha B, Rubinstein E. Therapy of experimental murine brucellosis with streptomycin alone and in combination with ciprofloxacin, doxycycline, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(11):2333-2336.
45. Felek S, Demirbağ K, Kalkan A ve ark. Therapeutic effects of rifampin and erythromycin in experimental murine brucellosis. *Clin Microbiol Infect* 2000;6(2):111-114.
46. Felek S, Kalkan A, Demirbağ K, Akbulut A, Kılıç SS. Deneysel fare brusellozunun tedavisinde rifampisin ve azitromisinin etkinliğinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 1999;13(2):223-226.

