

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BRUCELLA SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK  
DUYARLILIKLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE  
BELİRLENMESİ**

“UZMANLIK TEZİ”

Dr. Fadime ARSLAN

AFYONKARAHİSAR-2006

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BRUCELLA SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK  
DUYARLILIKLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE  
BELİRLENMESİ**

“UZMANLIK TEZİ”

Dr. Fadime ARSLAN

Danışman: Doç.Dr. Orhan Cem AKTEPE

AFYONKARAHİSAR-2006

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Başlığı :** *Brucella* Suşlarında Antibiyotik Duyarlılıklarının  
Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi

**Tezi Hazırlayan :** Arş. Gör. Dr. Fadime ARSLAN

**Tez Savunma Tarihi :** 12.05.2006

**Tez Kabul Tarihi :** 12.05.2006

**Tez Danışmanı :** Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE

İş bu çalışma jürimiz tarafından MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak  
kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE

ÜYE ÜYE

Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA Yrd. Doç. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ

ONAY

DEKAN

I

**TEŞEKKÜR**

Tez çalışmalarım ve uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden

faýdalandığım, tez danışmanım ve Anabilim DalıBaşkanımız Doç.Dr. Orhan Cem AKTEPE'ye yardımları için teşekkür ederim.

Doç.Dr. Zafer ÇETİNKAYA başta olmak üzere, uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım süresince katkı ve desteklerini esirgemeyen bölümdeki diğer hocalarıma teşekkür ederim.

Osman Gazi Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Gül DURMAZ'a, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan Doç.Dr. Özay AKAN'a, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Gönül ASLAN'a destek ve bilimsel katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalışanlarına, ayrıca her zaman desteğini gördüğüm aileme teşekkür ederim.

II

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
KISALTMALAR.....	IV
TABLO LİSTESİ.....	VI
I-GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II-GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. TARİHÇE.....	3
II.2. ETKENİN ÖZELLİKLERİ.....	4
II.2.1. Kültür Özellikleri.....	5
II.2.2. Antijenik Yapı.....	7
II.2.3. Genetik Özellikleri.....	10
II.2.4. Dirençlilik.....	11
II.3. EPİDEMİYOLOJİ.....	12
II.4. HASTALIĞIN BULAŞ YOLLARI.....	15
II.5. PATOGENEZ.....	16
II.6. KONAK İMMÜNİTESİ.....	19
II.7. KLİNİK.....	21
II.8. KOMPLİKASYONLAR.....	23
II.8.1. Osteoartiküler Komplikasyonlar.....	24
II.8.2. Gastrointestinal Komplikasyonlar.....	24
II.8.3. Genitoüriner Komplikasyonlar.....	25
II.8.4. Nörobruselloz.....	25
II.8.5. Kardiyovasküler Komplikasyonlar.....	26
II.8.6. Pulmoner Komplikasyonlar.....	27
II.8.7. Hematolojik Komplikasyonlar.....	27
II.8.8. Kutanöz Komplikasyonlar.....	28
II.8.9. Oküler Komplikasyonlar.....	28
II.8.10. Diğer Komplikasyonlar.....	28
II.9. TANI.....	28
II.9.1. Direkt Etyolojik Tanı Yöntemleri.....	30
II.9.2. İndirekt Tanı Yöntemleri.....	34
II.9.3. Radyolojik Tetkikler.....	42
II.10. BRUCELLA SUŞLARININ İDENTİFİKASYONU.....	42

II.11. TEDAVİ.....	44
II.11.1. Destek Tedavisi.....	44
II.11.2. Özgül Tedavi.....	44
II.11.3. Bruselloz Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler.....	46
II.12. BRUSELLOZDA KORUNMA VE KONTROL.....	50
<b>III. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>53</b>
III.1. İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON.....	53
III.1.1. Gram Boyama Yöntemi.....	54
III.1.2. Katalaz ve Oksidaz Reaksiyonları.....	54
III.1.3. CO <sub>2</sub> Gereksinimleri.....	55
III	
III.1.4. Hidrojen Sülfür Üretimi (H <sub>2</sub> S).....	55
III.1.5. Kurşun AsetatlıKağıt Hazırlanması.....	55
III.1.6. Boyalarla Birlikte Üreme.....	55
III.1.7. Üreaz Deneyi.....	56
III.2. KULLANILAN BESİYERLERİ.....	56
III.3. KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER.....	58
III.3.1. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	58
III.4. MİKRODİLÜSYON.....	59
III.5 AGAR DİLÜSYON.....	60
III.6. E test YÖNTEMİ.....	60
<b>IV. BULGULAR.....</b>	<b>61</b>
<b>V. TARTIŞMA.....</b>	<b>65</b>
<b>VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>80</b>
<b>VII. ÖZET.....</b>	<b>82</b>
<b>VIII. SUMMARY.....</b>	<b>84</b>
<b>IX. KAYNAKLAR.....</b>	<b>86</b>

IV

#### KISALTMALAR

S : Smooth

R : Rough

ONPG : Orthonitrophenyl–beta–D–galactopyranoside

H<sub>2</sub>S : Hidrojen Sülfür

CO<sub>2</sub> :Karbondioksit

I : İntermedier

M : Mukoid

LPS : Lipopolisakkarit

OMP : Outer Membrane Protein

SDS : Sodyum Dodesil Sulfat

HS : Hot saline

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

RES : Retikuloendotelial Sistem

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :Hidrojen peroksid

PMNL : Polimorfonükleer Lökositler

IFN-γ : İnterferon-gamma

TNF- $\alpha$  : Tumor nekroz faktör-alfa  
IL : İnterlökin  
Ig : İmmünoglobulin  
SSS : Santral Sinir Sistemi  
BOS : Beyin Omirilik Sıvısı  
DIC : Dissemine İntravasküler Koagülasyon  
ADH : Antidiüretik Hormon  
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu  
CDC : Centers for Disease Control and Prevention  
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü  
STA : Standart Tüp Aglütinasyon  
RTD : Rutin Test Dilüsyonu  
ELİSA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
V  
KFT : Kompleman Fiksasyon Testi  
MİK : Minimal İnhibitör Konsantrasyon  
MDP : Metilen difosfanat  
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute  
DOX : Doksisisiklin  
SM : Streptomisin  
CIP : Siprofloksasin  
RF : Rifampisin  
AZM : Azitromisin  
TMP/SMZ : Trimetoprim/sulfametoksazol  
S : Susceptible  
R : Resistance  
I : Intermediate  
BSAC : British Society for Antimicrobial Chemotherapy  
VI

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo-I</b> : <i>Brucella</i> Genusundaki Türler ve Biovarların Ayırtıcı Özellikleri.....	6
<b>Tablo-II</b> : <i>Brucella</i> Türleri ve Biovarlarında Dış Membran Proteinlerini Kodlayan Genlerin PCR-RFLP Paternleri.....	12
<b>Tablo-III</b> : <i>Brucella</i> İnfeksiyonu Strasında İmmün Cevap.....	20
<b>Tablo-IV</b> : Kullanılan Antibiyotiklerin Çözücü ve Sulandırıcıları.....	59
<b>Tablo-V</b> : Antibiyotiklerin Ortalama Değerleri, MİK Aralıkları, MİK <sub>50</sub> ve MİK <sub>90</sub> Değerleri.....	62
<b>Tablo-VI</b> : Yöntemlere Göre Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	64
<b>Tablo VII</b> : Türkiye’de <i>Brucella</i> Suşlarında Yapılan Antibiyotik Duyarlılık Çalışmaları.....	78

1

## I-GİRİŞ VE AMAÇ

Bruselloz, *Brucella* cinsi bakteriler ile oluşan bir zoonozdur. Koyun, keçi, sığır, manda, domuz gibi hayvanların etleri, sütleri, idrarları, vücut sıvıları, gebelik materyalleri ve süt ürünleri aracılığı ile insanlara

bulaşmaktadır (1,2).

Günümüzde, özellikle patojenite ve konak seçimi göz önünde bulundurularak 6 tür tanımlanmaktadır: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis* ve *Brucella canis*.

Ülkemizde insan brusellozunda etken olarak en sık saptanan türler;

□ *B.melitensis*,

□ *B.abortus*,

□ *B. suis* ve daha az oranda da *B.canis*'dir (3).

Hastalık dünyanın her bölgesinde görülebilmekle birlikte ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri, Arap yarımadası, Hindistan, Meksika, Orta ve Güney Amerika'da hiperendemiktir. Tüm dünyada yıllık 500.000 yeni bruselloz olgusu olduğu tahmin edilmektedir (4,5).

İnsanlarda uzun süreli bir hastalığa neden olan bruselloz fizik yetersizliği ve işgücü kaybına neden olurken; tedavi ve hastane giderleri de önemli bir ekonomik kayba neden olmaktadır. *Brucella* cinsi bakteriler hücre içinde yerleşim gösterdiği için tedavide birden fazla antibiyotiğin uzun süre (en az 6 hafta) uygulanması gereklidir. Başarılı bir tedavi için hücre içine yüksek yoğunlukta girebilen antibiyotikler gerekmektedir. Kısa süreli ampirik tedaviler infeksiyonun sıklıkla nüks etmesine neden olmaktadır. Klasik sağaltım rejimleri ile yaşanan relapslar, kullanılan antibiyotiklerle ilgili yaşanan problemler nedeniyle brusellozda yeni antibiyotik arayışları sürmektedir.

2

Bruselloz ülkemiz ve bölgemizde oldukça yaygın olması, tüketilen gıdalar ve mesleki uğraş ile yüksek bulaşma riski taşıması, uzun süreli tedavi gerektirmesi, ekonomik yönden zarar verici olması nedeniyle halk sağlığı yönünden de önem taşıyan bir hastalıktır.

Çalışmamızda *Brucella* suşlarının hücre içine iyi penetre olabilen çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıklarının farklı yöntemlerle belirlenmesi ile hastalığın kontrolü ve sağaltımına katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Afyon bölgesinde ve çevre illerde bruselloz tanısıyla izlenen hastalardan izole edilen 50 *B.melitensis* suşuna karşı çeşitli antibiyotiklerin in vitro duyarlılıkları agar dilüsyon, mikrodilüsyon ve E test olmak üzere üç yöntem kullanılarak araştırılmış, sonuçlar uyum açısından karşılaştırılmıştır.

3

## II-GENEL BİLGİLER

### II.1. TARİHÇE

Bruselloz ilk kez Hippocrates tarafından "humma" olarak tanımlanmıştır. *Brucella* infeksiyonları için günümüze değin değişik isimler kullanılmıştır.

Hastalık ilk kez Malta Ada'sında saptandığından "Malta Humması", "Akdeniz Humması" ya da "Gibraltar Humması"; tipik ateştrasesi nedeni ile "Dalgalı Humma (Ondülan Ateş)"; koyunlardan insanlara bulaşması nedeni ile halk arasında "Koyun hastalığı" veya "Mal hastalığı" gibi isimlerle anılır.

1859 yılında J.A. Martson hastalığın tarifini yapmış, 1886'da ilk olarak David Bruce, Malta Humması sebebiyle ölen hastaların dalak pulpasından hastalık etkenini izole etmiş ve küçük koklar şeklinde görüldüğünden "*Micrococcus melitensis*" şeklinde isimlendirmiştir. 1918 yılında keşfeden kişinin adına ithafen "*Brucella melitensis*" olarak adlandırılmasına karar verilmiştir.

1897 yılında M.L. Hughes hastalığı "Malta humması ve dalgali humma" olarak adlandırmış, yine aynı yıl Bernard Bang Danimarka'da sığırlardan bakteriyi izole etmeyi başarmıştır. Fetusdan elde edilen ve düşüğe sebep olan bu bakteriye "*Bacillus abortus*" ismi verilmiştir. Aynı yıl Wright bruselloza yakalanan hastaların ve aşıli hayvanların kanında *B.melitensis*'e karşı aglutininlerin varlığını göstermiş, ayrıca hastalığın tanısı için günümüzde kullanılmakta olan, serum aglutinasyon testini ilk kez gerçekleştirmiştir. 1905 yılında ise Zammit, keçilerin *B.melitensis*'in rezervuar olduğunu, çığ süt kullanımının önlenmesi yolu ile hastalıktan korunulabildiğini belirlemiştir. O dönemde askeri personelin, pastörize edilmemiş keçi sütünü tüketmesi engellenerek hastalık insidansında dramatik azalma sağlanmıştır. 1914'de Traum domuzlardan *B.suis*'i,

4

1966'da Carmichael köpeklerden *B.canis*'i izole etmiştir. *B.ovis* 1953'de koyunlardan, *B.neatomae* 1957'de ratlardan izole edilmiştir (6).

Ülkemizde ilk defa 1915 yılında Kuleli Hastanesi'nde bir erde Hüsamettin Kural ve Mahmut S. Akalın tarafından *B.melitensis*, 1931'de sığırlardan Zühtü Berke; koyun ve keçilerden 1943'de Golem, 1944'de ise Köylüoğlu ve Aktan *Brucella* cinsi bakterileri izole etmişlerdir (1,7).

## II.2. ETKENİN ÖZELLİKLERİ

*Brucella* türleri 0.5-0.7 µm eninde, 0,6-1,5 µm boyunda kok, kokobasil veya kısa çomaklar şeklinde gram negatif bakterilerdir. Kenarları hafif konveks ve uçları yuvarlaktır. Tek olarak, daha az sıklıkla ikili, kısa zincirler veya küçük kümeler halinde bulunurlar. Bazen sıvı besiyerlerinde 3-5'li zincirler yapabilirler. Kapsülsüz, sporsuz ve hareketsizdirler. Küçük olduklarından moleküler hareket nedeniyle yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). Organizmadan yeni ayrıldıkları zaman S tipi kolonilerde ince bir kapsüllerinin bulunduğu saptanır. Pasajlarla ve R koloni şekillerinde bu kapsüller kaybolur (7,8,9).

*Brucella* cinsindeki bakteriler katalaz ve çoğu kez oksidaz olumludurlar. Üreaz aktiviteleri değişken olup sitrat deneyi ve ONPG (Orthonitrophenyl-beta-D-galactopyranoside) negatiftir. Nitratları nitritlere indirgerler. Karbonhidratlardan asit ve gaz yapmazlar ancak glikozu az miktarda kullanırlar. Sütte hafif alkali reaksiyon yaparlar. Jelatini eritmezler ve indol oluşturmazlar. Metil red ve Voges-Proscauer testleri negatiftir. H<sub>2</sub>S oluşturma miktarı ve süresi değişkendir (7).

Bütün dünyada en patojen türler; insanlarda çok şiddetli infeksiyona yol açan ve koyun, keçi gibi hayvanlarda bruselloza neden olan *B.melitensis*, sığırlarda görülen brusellozun en önemli etkeni olan *B.abortus*, domuz brusellozunu oluşturan *B.suis*'tir. Bu üç *Brucella* türü konaklarda

düşüklere ve dolayısıyla büyük ekonomik kayıplara yol açarlar. *B. ovis* ve

5

*B. canis* sırasıyla epididimit ve köpek brusellozunun etkenidirler.

*B. neotomae* ise çöl farelerinden izole edilen tek türdür. *B. melitensis* (biovar 1,2,3), *B. abortus* (biovar 1,2,3,4,5,6 ve 9), *B. suis* (biovar 1,2,3,4,5) biovarlara sahiptir. Türler ve biovarlar fenotipik karakterler, faj tipleri, boyalara karşı olan duyarlılık, CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S üretimi ve bir takım metabolik özelliklere göre belirlenmiştir (10,11).

### II.2.1. Kültür Özellikleri:

*Brucella* türleri intrasellüler yaşadıklarından dolayı beslenme gereksinimleri komplekstir. Özellikle ilk izolasyonda kompleks besiyerlerinin kullanılması gerekir. Et özütü, triptoz gibi kompleks peptonlu, glikoz ve tuz içeren besiyerlerinde iyi ürerler. Bazı türlerin üreyebilmeleri için besiyerlerine tiamin, niasin, biotin, nikotinik asit, bazen serum eklemek gerekir. *Brucella*'ların üretilmesi için antibiyotikli-glikozlu-serumlu buyyon ve agar, *brucella* buyyonu ve agarı, çikolotamstağar, albimi buyyon ve agarı, Kanlıjelöz gibi çeşitli besiyerleri geliştirilmiştir (3). Jelözdeki 2-3 günlük kolonileri küçük, yuvarlak, kabarık, saydam, şebnem tanesine benzeyen, kaygan, S şeklindedir. Eski kültürlerde R kolonileri oluşur. 6-7 günlük bir süre sonunda koloniler matlaşır ve ayrışmaya başlarlar. R koloni formundakiler yassı, daha büyük çapta, mat ve granüllü bir yüzeye sahiptirler. Belirtilen bu iki ana S, R formundan başka, intermedier (I) ve mukoid (M) özellik gösteren koloni varyasyonları da vardır. Ayrıca *Brucella*'ların antibiyotik ve kimyasal maddelerden etkilenmeleriyle L formları da meydana gelebilir (3).

*Brucella*'lar aerop ve mikroaerofil bakteriler olup, CO<sub>2</sub> ile üremeleri artar. Özellikle *B. abortus* ilk izolasyonda % 5-10 CO<sub>2</sub>' li ortama ihtiyaç duyar. Optimal üreme sıcaklığı 37°C olmakla birlikte, 10-40°C arasında da üreyebilirler. Optimal pH: 6.7-7.4'tür. Kolonileri inkübasyondan 2-3 gün sonra görülebilir. Fakat 4-5 gün sonra 2-3 mm çapa ulaşırlar. Zengin besiyerlerinde düzgün kenarlı, konveks, nemli, parlak koloniler oluştururlar.

6

### Tablo I: *Brucella* Genusundaki Türler ve Biovarların Ayırıcı Özellikleri

Boya maddelerinin bulunması halinde üreme Monospesifik

antiserumlarla

aglutinasyon

Fajlar ile lizis (RTD'da Biovar CO<sub>2</sub>)

Gereksin

imi

H<sub>2</sub>S

üretimi

Üreaz

Oluştur

ma

Thionin

a b c

Fuchsin

a b c A M R Tb WB Bk2 Fi

Mutat Host

Rezervuar

*B. mellitensis* 1 - - D + + + + + - - - NL NL L NL Koyun, keçi

2 - - D + + + + + - - - NL NL L NL Koyun, Keçi

3 - - D + + + + + - - - NL NL L NL Koyun, keçi

*B. abortus* 1 + + X - - - - - - - - L L L L Sığır

2 ++ X - - - - - - - - - L L L L Sığır  
3 ++ X + + + + + + + - - L L L L Sığır  
4 ++ X - - - + + + - - - L L L L Sığır  
5 - - X - + + + + + - - - L L L L Sığır  
6 - + X - + + + + + - - - L L L L Sığır  
7 - + X - + + + + + - - - L L L L Sığır  
8 + - X - - + + + - - - - L L L L Sığır  
9 - + X - + + + + + - - - L L L L Sığır  
**B.suis** 1 - + Y + + + - - - - - NL L L PL Domuz  
2 - - Y - + + - - - - - - NL L L PL Domuz  
3 - - Y + + + - - + + - - NL L L PL Domuz  
4 - - Y + + + - - + + + - NL L L L Ren geyikleri  
5 - - Y + + + - - - - - - NL L L PL Sıçan,  
kemiriciler  
**B.canis** 1 - - Y + + + - - D - - + NL NL NL NL Köpek  
**B.neotamae** 1 - + Y - - - - - - - - PL L L L Neotoma lepida  
**B.ovis** 1 + - Y + + + + + - - + NL NL NL NL Koç  
D: değişken, a: 1/25.000, b: 1/50.000, c: 1/100.000, X= 1-2 saatte, Y= 0-30dakika RTD: Rutin test dilüsyonu, Tb: T bilisi, Wb: Weyridge, Bk2:  
Berkeley, Fi: Firenze  
L: Lizis, PL: Parsiyel lizis, NL: Lizis olmayan

7

Kolonileri hemolizsiz, pigmentsizdir. *B.melitensis* ve *B.abortus*'un bazitürlerinin kolonileri, eski kültürlerde esmer-kahverengi renk alabilirler. *B.canis* ve *B.ovis*'in kolonileri R formunda, diğer türlerin kolonileri S formundadır (7).

## II.2.2. Antijenik Yapı:

*Brucella*'ların antijenik yapıları türlere göre farklılıklar göstermektedir. Bakterilerin ultrasantrifugasyon ya da dondurma-çözme işlemleri ile parçalanıp, elde edilen karışımın filtrasyonu sonucu ayrılan üst sıvı, bağışık seruma karışımimmüelektroforeze tabi tutulduğunda 20'den fazla antijen-antikor reaksiyonunun varlığı görülür. Farklı suşlarla yapılan karşılaştırma çalışmaları, bir çok *Brucella* antijeninin tüm suşlarda ortak olarak bulunduğunu; sadece somatik-LPS (lipopolisakkarit) antijenlerinin S tipinden olan ve olmayan suşlarda önemli farklılıklar gösterdiğini; dış membran proteinlerinin ise farklı türlerde değişik yapılarda olduklarını göstermiştir (2,12). Major antijen olan LPS antijenleri hücre yüzeyinde yer aldıkları halde, protein antijenlerinin büyük kısmı hücre içinde bulunur (2).

### 1- Yüzey antijenleri:

Diğer Gram negatif bakterilerde olduğu gibi *Brucella*'ların yüzey katmanlarından içteki sitoplazma membranı ve bunu çevreleyen sert peptidoglikan tabaka, fosfolipidler, LPS ve proteinleri içeren bir dış membrandan ibarettir (12). Hücre duvarı bakterinin stabilizasyonu için anatomik ve fonksiyonel bir bariyerdir, hastalık esnasında konak immunitesi ilk karşılaşılan kısımdır.

*B.melitensis*, *B.abortus* ve *B.suis*, A (abortus) ve M (melitensis) 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

8

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. 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. *Brucella* 'ların ayrıca Salmonellalardaki Vi antijenlerine benzer L antijenleri de gösterilmiştir. Daha çok *B.abortus* tiplerinde bulunmuş olan L antijeni, yeni izole edilen bakterilerde var olup, onların immun serumlarla aglutinasyonuna engel olmaktadır. Bu durum, serumların 100°C'de yarım saat ısıtılmasıyla ortadan kalkar.

*Brucella* cinsi bakteri antijenlerinin *Escherichia coli* O:116 ve O:157, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Francisella tularensis* ve *Vibrio cholera*, N grubu *Salmonella* türleri gibi bakteriler ile çapraz reaksiyon verdiği de saptanmıştır (7).

*B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis* türleri; major yüzey antijeni olarak, O zinciri içeren smooth lipopolisakkarit (S-LPS) taşıdıklarında S, O zinciri bulunmayan rough lipopolisakkarit (R-LPS) varlığında ise R suşlar olarak ortaya çıkarlar. S-LPS en önemli virülans faktörüdür. S-LPS'nin yapısındaki O zinciri *Brucella* hücre yüzeyinin en önemli antijenik yapıdır. Ayrıca infekte vücutta antikor cevabı için immünodominant olup, günümüzde S koloni yapan *Brucella* suşları tarafından oluşturulan infeksiyonların serolojik tanısı için kullanılan testlerde major antijenik yapıdır (10,13,14,15).

Lipopolisakkaritlerin yanı sıra, *Brucella* 'nın dış membranı major dış membran proteinleri (Outer Membrane Proteins-OMPs) tarafından oluşturulur. OMP, sodyum dodesil sulfat (SDS) kullanılarak ayrıştırılabilir. (10,11,16,17).

9

Mikroorganizmaların yüzeyinde koruyucu özelliğe sahip iki immunojenik fraksiyon bulunmaktadır. Bunlar sodyum dodesil sulfat insolubl (SDS-I) hücre duvarı fraksiyonu ve sıcak tuzlu su (hot saline-HS) ekstraktıdır (18,19).

*B.abortus* 'un SDS-I fraksiyonu moleküler ağırlıkları 25-27 (Grup 3) ve 36-38 kDa (Grup 2) olan, ayrıca peptidoglikanla sıkıca bağlı büyük membran proteininin tarafından oluşturulur. Grup 2 proteinleri porin proteinleri olarak adlandırılır (20). *B.melitensis*'in SDS-I fraksiyonu yine peptidoglikanla sıkıca bağlı, 31-34 kDa (Grup 3) ağırlığında başka bir major OMP içerir. Dış membran proteinlerinin immunojenik özellikleri zayıftır ve kendilerine karşı heterojen bir antikor cevabı oluşturur. Bu türlerde asıl immunojenik cevap, S suşlarında SDS-I fraksiyon yapısının %1'den daha azını oluşturan S-LPS tarafından sağlanır (18, 21).

*B.ovis* ve *B.canis* major yüzey antijeni olarak R-LPS taşıdıklarından dolayı R suşlarıdır, yüzeylerinde O zinciri taşımazlar (14). *B.ovis* 'in HS ekstraktı antijenik özelliğe sahiptir (22). Bu ekstrat R-LPS ve Grup 3 proteinlerinin daha baskın olduğu major membran proteinleri tarafından oluşturulur. Grup 3 proteinlerinden özellikle 31-34 kDa ağırlığında olanlar, *B.ovis* infeksiyonlarında kuvvetli bir antikor yanıtı oluştururlar (23,24). Son zamanlarda 25-27 kDa ağırlığındaki dış membran proteinlerinin *B.melitensis*, *B.abortus* ve *B.suis*'in virülansında rol oynadığı da gösterilmiştir. Omp 25 genlerinin uzaklaştırıldığı mutant suşlar aşılama

çalışmalarında kullanılmaktadır (25).

### **2-İç protein antijenleri:**

Bu bölgede yer alan proteinler (A1, A2, A5,.....X antijenleri ) deri deneylerinde rol oynarlar (2). Çoğu henüz tam olarak karakterize edilememiştir. Bununla birlikte A2 antijeni gel elektroforezinde 10

dayanıklı, yüksek molekül ağırlıklı bir glikoprotein olarak tanımlanmıştır (26).

*Brucella*'nın protein ekstraktları geç tip aşırı duyarlılık için yapılan deri testlerinde antijen olarak kullanılmıştır. En az 20 protein içeren ve Brucellin-INRA adını alan *B.melitensis B115*'in saline ekstraktları iyi tanımlanmış intradermal allerjen preparatlarıdır (27).

### **3-Tanısal antijenler:**

Tanısal testlerle ilgili çok az antijen ciddi pürifikasyon çalışmalarının eksikliği nedeni ile moleküler düzeyde tanımlanabilmiştir. Standart testlerde (aglutinasyon, kompleman fiksasyon, rose bengal, ring testi) rol oynayan major antijen S-LPS'dir. İmmünodiffüzyon ve immünoelektroforez testlerinde kullanılan intrasellüler A2 antijeni bazı durumlarda infekte hayvanların aşılanmış olanlardan ayırt edilmesinde kullanılabilir (27).

### **4-Koruyucu Antijenler:**

Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, koruyucu immünitinin *Brucella* hücre duvarının peptidoglikan fraksiyonuyla stimüle edilebileceğini göstermiştir. Aktif komponentler arasında S-LPS, OMP ve muhtemelen diğer komponentler yer alır. *Brucella*'ya karşı doğal konakçının korunmasında ilgili antijenlerin tam olarak belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (27).

### **II.2.3. Genetik Özellikleri:**

Filogenetik olarak *Brucella* cinsi, bakterilerin *Rhizobiaceae* grubuna aittir. Ayrıca *Proteobacteria* sınıfının  $\alpha$ -2 alt sınıfı ile yakından ilişkilidir. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, bilinen 6 *Brucella* türü arasında %90'dan daha fazla benzerliği ortaya koymaktadır (10,11,28,29).

11

*Brucella*'lar iki kromozoma sahip olup, bu da üç rRNA peronunu içeren kromozomal bölgelerin değişik düzenlenmeleri ile açıklanmaktadır (30). Kromozomlarda bulunan genlerin en önemlileri özellikle major dış membran proteinlerini kodlayanlar olup, *Brucella* türleri ve biovarlarının belirlenmesinde açık bir rol oynamaktadırlar. Örneğin; 36-38 kDa ağırlığındaki major porin dış membran proteinleri (Grup 2) *omp2* lokusunda kodlanmaktadır. Bu lokus birbiriyle çok yakın benzerlik gösteren (>% 85) *omp2a* ve *omp2b* genlerini içermektedir (31,32). %34 oranında benzer olan diğer iki *Brucella* geninden; *omp25*, 25-27 kDa; *omp31*, 31-34 kDa ağırlığındaki (Grup 3) dış membran proteinlerini kodlamaktadır (33). *Brucella* türleri ve biovarlarında dış membran proteinlerini kodlayan genlerin Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) paternleri Tablo II'de gösterilmiştir (34).

### **II.2.4. Dirençlilik:**

*Brucella* bakterileri ısıve dezenfektanlara duyarlıdır, 60°C’de ısıtılmakla 10 dakikada, %1 fenol eriyiğinde ise 15 dakikada ölürlür. Süt içinde 17 gün yaşadığı, tereyağında 142 gün canlıkaldığı, dondurmalarda 1 ay, tuzlanmış domuz etinde 3 hafta, çeşme suyunda 8°C’de 57 gün, 25°C’de ise 10 gün canlılığını koruduğu, insan idrarında en az 7 gün, hayvan dışkısında açıkta 100 gün, ahırların duvar ve döşemesinde 4 ay canlıkaldığı bildirilmiştir. Düşük yapmış hayvan fetüsünde 75 gün, %10 tuz içeren salamura peynirde 45 gün, %17 tuz içerende 1 ay yaşayabilir. Kültürler buzlukta 3-6 ay canlı kalabilir. Pastörizasyon esnasında çabuk ölmelerinin epidemiyolojik değeri vardır (1,35,36).

12

**Tablo II: *Brucella* Türleri ve Biovarlarında Dış Membran Proteinlerini Kodlayan Genlerin PCR-RFLP Paternleri**

*Brucella* spp. Biovar omp2a omp2b omp25 omp31

***B.melitensis*** 1

2

3

R

B, C

B

B

B, C

B, D, E

E

B, D, E

B

B

B

B

B

A

A

A

A

***B.abortus*** 1

2

3

4

5

6

9

R

A

A

B

A

B

B

B

A

A

A

B

B  
B  
B  
B  
A, C  
A  
A  
A  
A  
A  
A  
A  
A  
A  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
-

***B.suis*** 1

2

3

4

5

D

E

D

D

F

B

F

G

G

B

A

A

A

A

A

A

B,C

A

A

A

***B.ovis*** - G H, I, J C D

***B.canis*** - D G A E, F

***B.neotomae*** - H K A A

R: Rough suşlar. Her büyük harf, bir gen için kullanılan restriksiyon enzimi ile aynıpaterni göstermektedir. Tek bir gen için aynıharf restriksiyon paternini yansıtırken, diğer bir gen için aynıpaterni göstermez.

### II.3. EPİDEMİYOLOJİ

Bruselloz, *Brucella* bakterilerinin yol açtığı, en sık görülen zoonotik hastalıklardan birisi olup, tüm olgularda doğrudan ya da dolaylı olarak

hayvan temasısöz konusudur. Dünyada insanlarda oluşan brusellozun insidansve prevelansıhakkında kesin bir şey söylemek oldukça zordur. İnsanlarda infeksiyon nonspesifik bulgulardan mafsals ağrılarına, meningoensefalite, eritematöz döküntülerden endokardite, lenf gangliyonları büyümesinden nefrite, orşite kadar değişen ciddi klinik tablolarla karşıımıza çıkar. Hayvanlar arasında etken daha çok genital organlarda yerleşir,

13  
plesentadan geçer, yavru atmalarına neden olur ve sütle dışarıatılır. Atılan yavru materyali, infekte plesenta ile temas, iyi pişirilmemişveya çiğsüt ve süt ürünlerini yemekle de insana geçer. İnfeksiyon geçişyollarının özelliği, aile içi salgınlar ve genişaralığa sahip klinik görünüm nedeniyle tanıda güçlükler çıkarır. Tanızorluğu ve bildirim zorunlu olmasına rağ

16  
**5-İnokulasyon:** Hayvanların sağaltımve aşılanmasnesnasında, ayrıca laboratuvar çalışmalarında iğne veya pipetle bakteri kazaen alınır (4).  
**6-Diğer geçiş yolları:** Bakteriyemik hastadan yapılan kan transfüzyonu, ayrıca kemik iliği transplantasyonu yolu ile de geçişolabilir (52,53).

## II.5. PATOGENEZ

*Brucella* bakterileri gastrointestinal sistem, deri, nadiren de solunum yolu veya diğer mukoza yüzeylerinden alındıktan sonra ilk üremesini bölgesel lenf bezlerinde (mezenterik, aksiler, servikal, supraklaviküler) yapar (1,54). Bakterinin oral yoldan alınımında; mide asiditesinin yetersizliği veya herhangi bir ilağla ya da diyetle nötralize edilmişolması, bakterinin geçişini kolaylaştırır (1,4).

Organizmaya girdikten sonra; fagosite edilen, ancak polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından öldürülemediş olan bakteriler hızla bölgesel lenf bezlerine ilerler ve burada üredikten sonra lenf yolu ile genel dolaşıma karışır. Gelişen bakteriyemi sonucunda tüm vücuda yayılır, bakterinin daha çok retiküloendotelial sistem (RES) organlarına lokalize olma eğilimi vardır. Özellikle dalak, karaciğer, kemik iliği ve lenf bezleri olmak üzere, organ fagositlerince tutulduktan sonra bu hücreler içinde öldürülemediş olan bakteriler intrasellüler olarak üremelerini sürdürürler (55).

Bakterilerin fagositik hücreler içinde yaşamasında etkili olduğu ileri sürülen mekanizmalar şunlardır (56):

1. Bakteriler fagolizozom füzyonunu engeller ve fagosite edilmelerine rağmen lizozomal enzimler ile ortadan kaldırılamazlar.
2. Bakteriler lizozomal enzimlere dirençlidir.

17

3. Bakteriler adenin ve 5'-guanozin monofosfat üreterek nötrofillerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit) oluşturmalarınıönlerler ve bu şekilde oksidatif mekanizmalara direnç gösterirler.
  4. Bakteriler sahip oldukları süperoksit dismutaz enzimi sayesinde reaktif oksijen metabolitlerini uzaklaştırarak oksidatif yıkıma karşıkoyarlar.
- Brucella* bakterilerinin virülansının dayandığı esas kesin olarak bilinmemektedir. Hücre adezyon ve invazyonunu sağlayan hücresel

komponentler karakterize edilememiş ve ayrıca *Enterobacteriae*'da olduğu gibi invazin genlerinin varlığını saptama çabaları başarısız kalmıştır.

Virülan *Brucella*'lar hem nonfagositik, hem de fagositik hücreleri infekte edebilirler. Nonfagositik hücreler arasında *Brucella*'nın granüler endoplazmik retikulumda lokalize olma eğilimi vardır.

Demir bağlayıcı proteinler veya diğer sideroforların brusellozun patogeneziindeki rolleri tam olarak bilinmemektedir. Genel olarak invivo demir azlığı mikrobiyal büyümeyi kısıtlamaktadır. Bununla birlikte yüksek demir konsantrasyonları, hidroksilamin ve hidroksil radikallerinin yapımını sağlayarak *Brucella*'nın inaktivasyonuna yol açmaktadır (55).

*Brucella*'ların hücre maddelerinden saf olarak elde edilen endotoksini fareler için çok toksiktir. Ancak bu endotoksin virülan ve avirülan kökenlerde aynı yapı ve miktarda bulunmuştur. Endotoksinin hastalık oluşturmada yine de rolü mevcuttur. Virülan suşlar, avirülanlara göre hücre içinde daha çabuk üremektedirler (3).

Major virülans faktörleri hücre duvarındaki S-LPS'dir. Dolayısıyla S-LPS taşımayan *B.canis* ve *B.ovis* suşları, düşük virülansa sahip, serum antibakteriyel aktivitesine karşı çok hassastırlar. Bakterinin patojenitesinden sorumlu bir ekzotoksini ise bulunamamıştır (4).

18

RES organlarında üreyen bakteri, buradan hematojen yolla önemli organlardaki mezensimal hücrelerin sitoplazmasına yerleşmektedir. İntrasellüler yerleşen bakteri epitel hücrelerini hasara uğratmaktadır. Oluşan klinik tablo, endotoksine duyarlılık ve bu epitel hücrelerinde oluşan değişiklikten kaynaklanmaktadır (3,57). Hastalığın klinik tablosu sorumlu *Brucella* türüne göre değişmektedir. Diğer türlerin aksine *B.melitensis*, PMNL içindeki bakteri öldürücü mekanizmalara direnç gösterir. Bu olayda, bakterinin içerdiği adenin ve guanozin monofosfat etkinliği ile PMNL'nin degranülasyonunun önlenmesinin önem taşıdığı sanılmaktadır. Ayrıca normal insan serumunun *B.abortus*'a karşı gösterilmiş olan bakterisidal aktivitelerinin de *B.melitensis*'e etkili olmadığı belirlenmiştir. Bu iki mekanizma, *B.melitensis*'in sahip olduğu yüksek virülans yeteneğini açıklamaktadır. *B.suis*'de invaziv etkilidir ve kemik, karaciğer, lenf nodları ve kemik iliğinde fokal nekroz ve süpürasyonlara sebep olur. *B.abortus* daha az invazivdir, hafif bir hastalık tablosuna yol açar ve invaze olduğu organda nekroz ve süpürasyon içermeyen granülomlar oluşturur. *B.canis* insanda bakteriyemi, lenfadenopati, splenomegali ve hafif bir hastalık tablosu oluşturur (58).

Geviş getiren hayvanların plasenta ve amniotik sıvılarında *Brucella*'lar için bir gelişme faktörü ve karbonhidrat kaynağı olan erythritol yapısında bir madde izole edilmiş olup, gebe hayvanların *Brucella*'lara karşı duyarlı olmaları bu şekilde izah edilebilmektedir (54). *Brucella* bakterileri sığır, keçi, domuz gibi hayvanların genital organlarına yerleşerek major klinik görünüm olan abortus ve steriliteye sebep olurlar. İnfekte hayvanlarda bakterilerin idrar ve sütte bol miktarda buldukları gözlenmiştir. İnsan plasentasında erythritol bulunmaz. Bu nedenle insanlarda bruselloza bağlı

düşük riski diğer bakteriyel infeksiyonların seyrinde görülebilecek düşük riskinden fazla değildir (3,4).

19

Hastalığın seyrinde görülebilen vaskülit, eritema nodosum, glomerülonefrit, endokardit, artrit, hepatit ve şiddetli cilt döküntülerinin immün kompleks hastalığına bağlı olduğu sanılmaktadır (6).

Intrasellüler mekanizmalar ile öldürülemeyen bakteriler yerleştiği RES organlarını büyütür. Bunun nedeni; büyük, tek nükleuslu hücrelerde gelişen progressif proliferasyondur. Hücre içerisinde üremekte olan bakteri, aynı zamanda antikör tehdidinden ve kullanılan antimikrobiyal ajanlardan uzun süre korunmuş olur. Bu nedenle tedavinin uzun sürmesi gerekmektedir. Mikroorganizmaya karşı immünitinin gelişmesi ve makrofajların aktive olması ile mikroorganizmalar öldürülmeye başlar ve bakterinin sahip olduğu hücre duvar yapısına dökülür. Organizmanın bu endotoksine yanıtı ile de hastalıkta görülen birçok belirti ortaya çıkar. Savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamayan bakteriler, granülom oluşumu ile sınırlandırılmaya çalışılır. Özellikle dalak, karaciğer ve kemik iliğinde; epitelioid hücreler, plazma hücreleri ve mononükleer hücreler ile çevrili granülomlar brusellozun karakteristik histopatolojik görünümünü oluşturur (1,4).

## II.6. KONAKİMMÜNİTESİ

Brusellozda konağın immün cevabı humoral ve hücre sel immün cevabın kombinasyonu şeklindedir.

Humoral immünite reinfeksiyona karşı korunmada etkili iken, bakterisidal fazda hücre sel immünite daha önemli bir görev almaktadır. İnfeksiyonun kontrolü ve eradikasyonu, T lenfositlerinden salgılanan lenfokinlerin makrofajları aktive etmesi ile sağlanır (4).

Hayvan modellerinde bruselloza karşı kazanılan immünitede, T hücrelerinin kontrolü ve uyarımı ile aktive olan makrofajların temel rol oynadığı gösterilmiştir (59). T hücre bağımlı immünitinin mekanizması tam anlaşılmasa da T hücreleri tarafından üretilen interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ve

20

interlökin 2 (IL-2) gibi sitokinlerin makrofaj aktivasyonunda en önemli araçlar olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca brusellozlu hastalarda serum IFN- $\gamma$  düzeylerinin arttığı da saptanmıştır (59,60).

Hastalığın 7-10. günlerinden itibaren duyarlı lenfositlerden salınmaya başlanan lenfokinler makrofajları uyarmakta, intrasellüler mikroorganizma öldürme işlemi hızlanmakta ve geçikmiş tipte aşırı duyarlılığın da gelişimi ile organ granülomları meydana gelmektedir (61).

Brusellozda şimdiye dek belirlenebildiği kadarı ile humoral immünite S-LPS'ne karşı gelişmektedir (62). Brusellozda humoral cevap olarak IgM, IgG ve IgA tipi antikörler oluşur; infeksiyonun ilk haftasında IgM antikoru sentezlenmeye başlar, ardından 7-14 gün sonra IgG antikörleri oluşur. Zamanla IgM titresi düşer, ancak postinfeksiyon döneminde yıllarca serumda düşük seviyede kalabilir. Tedavi sonucu IgG antikörlerinde de iyileşme ile uyumlu olarak düşme meydana gelir. Bu düşme süresi tam belli

değildir. IgG titresinde düşme olmaması veya tekrar yükmesi nüks veya kronik infeksiyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir (4). IgA antikorları ise hastalığın erken safhalarında yükselir, ilerleyen aylarında önemli ölçüde azalır. Ama IgG antikor düzeyleri daha az miktarda devamlı olarak kalır (63). Yüksek IgG seviyelerinin tek başına relapsın bir göstergesi olmadığı, beraberinde IgA artışıının da olması gerektiği ileri sürülmektedir. Yine kronik brusellozlu hastalarda sadece IgG ve IgA’larda anlamlı yükseklikler tespit edilmiştir (63,64).

**Tablo III: Brucella İnfeksiyonu Strasında İmmün Cevap (65)**

**Bruselloz evresi IgM IgG IgA**

Akut ↑↑↑↑ ↑↑↑ (IgG1 ve IgG3) ↑

Kronik Ø ↑↑ (IgG1 ve IgG4) ↑↑

Relaps Ø ↑↑ ↑

21

Humoral immün cevap, infeksiyonun tamamen eradike edilmesinde yeterli değildir. Bakterilere karşı oluşan antikorlardan daha çok infeksiyonun serolojik tanısında yararlanılmaktadır (66).

## II.7. KLİNİK

Bruselloz birçok organ ve sistemi tutabildiğinden geniş bir klinik yelpazeye sahiptir. Hastalığın klinik seyri konağın direncine, yaşına, etkenin türüne, virülansına ve uygun antimikrobiyal tedaviye kadar geçen süreye bağlı olarak değişiklik gösterir.

Hastalığın kuluçka süresi, bir haftadan birkaç aya kadar değişmekle birlikte, genelde 6-20 gün kadardır. Semptomların başlangıçları veya sinsi olabilir. Vakaların yaklaşık yarısını, kalan yarısını sinsi başlangıçlıdır (67).

Bu sebeple hastalar hekime; septisemi şeklinde akut belirtilerle, subakut veya fokal odak belirtileri veya tüberküloza benzeyen kronik belirtilerle başvurabilirler. Semptomlar nonspesifik olduğundan, hastalara yanlış teşhisler konabilir ve hekimler tarafından dikkate alınmayabilir (67).

Akut seyir ve periferik büyük eklemlerin (kalça, diz, dirsek, omuz, ayak bileği) tutulumu daha çok çocuk ve genç erişkin döneminde görülürken, kronik seyir ve spondilit, vertabral osteomyelit ve paravertebral abseler yaşlılarda daha sıktır.

Titreme ile yükselen ateş, gece terlemesi başağrısı, halsizlik, kilo kaybı ve eklem tutulumu olan kişilerde ilk akla gelmesi gereken hastalıklardandır. Semptomların süresine göre brusellozun temelde üç farklı klinik formu vardır (67). Bunlar;

1-Akut bruselloz (başlangıç süresi 8 haftadan kısa),

2-Subakut bruselloz, ondulan form (başlangıç süresi 8-52 hafta arasında),

3-Kronik bruselloz (başlangıç süresi 52 haftadan uzun).

22

**Akut bruselloz:** Brusellozun tipik klinik formudur. Ateş, terleme, iştahsızlık, halsizlik, başağrısı, miyalji ve sırt ağrısı gibi genel infeksiyon belirtileriyle başlar. Vakaların %50’sinde ani başlangıç görülür (4). Ateş olguların %60’ında intermittan karakterdedir ve özellikle geceleri 38-



39°C'ye kadar ulaşır. Akut vakalarda en sık rastlanan fizik muayene bulguları; ateş, hepatomegali, splenomegali ve omurga üzerine basmakla ağrıdır. Özellikle *B.melitensis*'in etken olduğu infeksiyonlarda sepsis şeklinde başlangıç ve fulminan seyir görülebilir (1,67).

**Subakut bruselloz:** Subakut formun klinik paterni çok değişken olduğundan, sebebi bilinmeyen ateş vakalarında akla gelmelidir. Akut form için tanımlanan semptomlar mevcuttur, fakat daha hafif seyirlidir (6). Ondülan ateş, kas ve iskelet sistemine ait belirti ve bulgular ön plandadır. Artrit, orşioepididimit, hematoljik tutulum ve göz tutulumuna akut formdan daha sık rastlanır. Olguların %5'inde nörolojik semptomlar (periferik nöropati, radikülit, papillit vb.) vardır. Ondülan ateş tedavi edilmemiş subakut olguların %60'ında görülür, rölatif bradikardi eşlik edebilir. Ateşin öğleden sonra yükselmeye başlaması ve geceyarısına doğru bol terleme ile düşmesi tipiktir (68).

**Kronik bruselloz:** Şikayetlerin teşhisten sonra 12 aydan daha fazla devam ediyor olması "kronik brusellozis" olarak adlandırılır. Kronikleşme 40 yaş üstündekilerde sık olup, çocuklarda çok nadir görülür (68). Kronik vakaların %85'i asemptomatik seyirlidir. Semptomlu vakalarda bulgular genellikle nonspesifiktir; subfebril ateş, nöropsikiyatrik şikayetler ön plandadır ve kronik yorgunluk sendromuna benzer semptomlar görülür. Fizik bulgular akut ve subakut vakalardaki kadar zengin değildir. Episiklerit ve üveit gibi oküler komplikasyonlar, depresyon ve nevrasteni gibi psikiyatrik komplikasyonlar kronik vakalarda daha sık görülür (67,68).

23

Bu üç klinik seyir dışında subklinik, relaps, reinfeksiyon ve lokalize komplikasyonlarla seyreden bruselloz olgularıda görülür.

**Subklinik Bruselloz:** Semptomsuz meslek hastalığı şeklinde yalnız serolojik olarak belirlenebilir. Çocuklarda bir kısım vaka asemptomatik seyirli olabilir (68).

**Relaps-Reinfeksiyon:** Tedaviden sonra hastalığın semptom ve bulgularının tekrarlanması veya tedaviden sonra yeni bir pozitif kan kültürü olması şeklinde tanımlanır. Bruselloz tam tedavi edilmesine rağmen %5'in üzerinde relaps görülür. Genellikle hastalıktan 3-6 ay sonra gelişir. Tedavili veya tedavisiz iyileştikten sonra yeniden akut olarak başlar. Relaps ve reinfeksiyonun ayırt edilmesi zordur. Relapsda klinik ve laboratuvar bulguları başlangıç hastalığından daha hafif gidişlidir, genellikle antibiyotik tedavisinin tekrarlanmasına cevap verirler (67,68).

**Fokal Bruselloz:** Bruselloz lokal bir organ tutabilir. Fokal bruselloz; genellikle sistemik hastalığın belirli bir organda daha fazla yakınma yada komplikasyonun göstergesi şeklindedir. Akut bruselloz vakalarının dışında hemen her sistemi tutan fokal formuna rastlanabilir (67,68).

## II.8. KOMPLİKASYONLAR

Bruselloz sistemik bir infeksiyon hastalığıdır ve bir çok doku ile organ tutulabilir. Spesifik organ tutulumları, "fokal veya lokalize hastalık" olarak tanımlandığı gibi komplikasyon olarak da tanımlanmaktadır (4).

Hemen hemen her sistem tutulabilmekle beraber, en sık tutulan sistemler; lökomotor sistem, gastrointestinal sistem, merkezi sinir sistemi, ürogenital sistem, hematolojik sistem, kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, deri ve oküler sistemdir (67).

24

İnsanlarda bruselloza neden olan türler arasında en sık akut ciddi hastalık tablosuna yol açan ve komplikasyonlara neden olan en virulan tür *B.melitensis*'tir. *B.suis*'in etken olduğu infeksiyonlar ise daha çok subakut ve kronik seyirli süpüratif destrüktif lezyonlarla seyretme eğilimindedir. *B.abortus* orta derecede ılımlı sporadik olgulara neden olur.

Komplikasyonlar daha nadirdir. *B.canis*'in neden olduğu infeksiyonların klinik seyri *B.abortus* infeksiyonuna benzer. *B.canis* sinsi başlangıçlı, sıklıkla nüks eden bir infeksiyona neden olur (67).

### **II.8.1. Osteoartiküler Komplikasyonlar**

En sık görülen komplikasyonlar kemik ve eklemlerle ilgili komplikasyonlardır. Hastaların %20-85'inde osteoartiküler şikayetler eşlik eder. En çok *B. melitensis* infeksiyonları sonucunda ortaya çıkar. Periferal eklem tutulumu en sık diz, kalça, ayak bileği ve omuz eklemlerinde görülür. Monoartiküler veya poliartiküler olabilir. Spondilit, artrit, osteomyelit, bursit ve tenosinovit bildirilmiştir. Brusellozlu bazı hastalarda dolaşan immün komplekslere bağlı olarak oluşan reaktif spondiloartropati meydana gelebilir (69). Osteoartiküler tutulumu olan hastaların %80'inde sakroileit veya spondilit vardır (70). Spondilit predominant olarak genellikle yaşlı hastalar arasında ve lumbal bölgede siktir, sakroileit daha çok gençlerde görülür (71).

### **II.8.2. Gastrointestinal Komplikasyonlar**

Gastrointestinal sistem komplikasyonları brusellozlu hastaların %70'inden fazlasında görülmektedir (72). Hastalığın başlangıç döneminde iştahsızlık, karın ağrısı, kusma, ishal ya da kabızlık gibi semptomlar siktir. Bruselloz sıklıkla karaciğeri tutar, %30-90 oranında karaciğer enzimlerinde yükselme görülür. Karaciğer fonksiyon testleri hafifçe bozular. Hastaların %15-60'ında yumuşak, hassas hepatomegali bulunur. Hepatik abse, akut kolesistit, ileit, kolit ve spontan peritonit, pankreatit ve mezenterik lenfadenite bağlı gelişen akut batın tabloları nadir de olsa bildirilmiştir (73,74,75).

25

*B.melitensis* ve *B.suis*'in neden olduğu infeksiyonlarda hepatik ve splenik abseler ve akut kolesistit diğer etkenlerle oluşan infeksiyonlara göre daha sık oluşur. *Brucella* hepatitinin patolojik bulgularının spektrumu değişkendir. *B.abortus* infeksiyonu granülomlarla karakterizedir, sarkoidoza benzer. *B.melitensis* ile viral hepatite benzer şekilde diffüz inflamasyon, parankimde yama şeklinde nekroz odakları ve çevresinde mononükleer hücre birikimi görülür (1,4).

### **II.8.3. Genitoüriner Komplikasyonlar**

Nadir görülen komplikasyonlardır. Brusellozlu erkeklerin %2-10'unda orşit veya epididimoorşit oluşur ve genitoüriner sistemde rastlanan

en sık komplikasyondur (76). Testisler ve epididim plazma hücreleri ve lenfositlerle infiltridir. Seminifer tübüluslarda atrofi vardır. Bruselloza bağlı gelişen granülomatöz orşit, akut veya kronik olarak genellikle tek taraflı şişlik şeklinde ortaya çıkar (77). Literatürde brusellozla ilişkili olarak interstisyel nefrit, pyelonefrit, mezangiokapiller glomerülofrit, IgA nefropatisi olguları bildirilmiştir (78,79,80). Gebe kadınlarda ilk trimesterde bu hastalığa bağlı olarak nadiren abortus görülür. Erken tanı ile tedavide başarı şansı yüksek olup infeksiyonun fetuse olan tehlikesi önlenmektedir (4).

Kadınlarda salpenjit, servisit ve pelvik abse nadiren de olsa görülmüştür (78,81). Ayrıca literatürde brusellozun seksüel yolla geçişinin olduğunu düşündüren vakalar bildirilmiştir (81).

#### **II.8.4. Nörobruselloz**

Brusellozda Santral Sinir Sistemi (SSS) tutulumu %2-5 oranındadır ve endemik bölgelerde daha sık görülen komplikasyondur (67).

Brusellozun nöropsikiyatrik komplikasyonları; menenjit, meningoensefalit, ensefalit, meningovasküler komplikasyonlar, 26

parankimatöz disfonksiyonlar, miyelit, parezi, parestezi, hemipleji, periferik nöropati/radikülopati, serebral veya serebellar abseler, Guillain-Barre sendromu, kranial sinir lezyonları, siyatik, myozit, rabdomiyoliz, depresyon ve psikozdur. Hastalarda baş ağrısı, depresyon ve mental durgunluk hali daha sık görülür (4,67,82).

Menenjit akut ve kronik en sık görülen SSS komplikasyonudur.

*Brucella* menenjiti genellikle hastalığın başlangıcında görülür. Ancak sistemik brusellozlu bazı olgularda tedaviden 1 yıl sonra *Brucella* menenjiti geliştiği rapor edilmiştir (83). Literatürde izole intrakranial hipertansiyon olarak ortaya çıkan nörobruselloz vakalarında vardır (84).

*Brucella* menenjitinde BOS (Beyin Omirilik Sıvısı) bulguları, kronik menenjit bulgularına benzer; basınç genellikle artmış, görünüm berrak, bulanık veya kanlı olabilir. Hücre sayısı lenfosit ağırlıklı olarak artmış, protein miktarı artmış, glikoz değerleri normal veya hafif azalmış saptanır. BOS kültürü olgularının yarısından azında üreme gösterir. BOS'da *Brucella* antikorlarının bulunması mümkündür ve çoğu kez teşhis için yeterlidir (4,82,85).

Kronik brusellozda psikiyatrik bozukluklar sıktır; depresyon, kronik yorgunluk, unutkanlık ve intihar girişimleri şeklindedir (4).

#### **II.8.5. Kardiyovasküler Komplikasyonlar**

Brusellozda kardiyak komplikasyonlar; endokardit, miyokardit, perikardit, aort kökü absesi, mikotik anevrizma, pulmoner anevrizmalı tromboflebit ve pulmoner embolidir (4,67,82).

Endokardit olguların %2'sinden azında görülür. Endemik bölgelerde bu oran %7-10'a çıkabilir (86), Hastaların %75'inde aort kapağı etkilenmiştir, mitral kapak tutulumu ise ikinci sıklıkta görülür. Hem doğal hem de prostetik kapaklarda tutulum olabilir (87). Perikardit, miyokardit,

mikotik aort anevrizması endokarditle komplike olabilir. Primer perikardit ve miyokardit nadiren görülen komplikasyonlardır. Endokardit az görülmesine karşın brusellozdan ölümlerin %80'i bu komplikasyona bağlıdır. Özellikle *B.suis* infeksiyonlarında daha sık rastlanır. Sadece antibiyotik tedavisi ile başarıyla tedavi edilen endokardit vakaları olmakla birlikte, genellikle kombine medikal ve cerrahi tedavi gerekir. Tedavi görmeyen veya yetersiz tedavi gören vakalar ilerleyici kalp yetmezliği ile kaybedilirler (4).

#### **II.8.6. Pulmoner Komplikasyonlar**

Brusellozlu hastaların yaklaşık %15-25'inde solunum sistemi ile ilgili şikayetler olmasına rağmen pnömoni ve plevral effüzyon olguların ancak %0.3-1'inde bildirilmiştir (88). Grip benzeri bir klinik veya kuru bir öksürüğün hakim olduğu tablo en sık görülen klinik şekildir. Daha çok kontamine aerosollerin inhalasyonu veya bakterilerin akciğerlere bakteriyemi ile yayılması sonucu ortaya çıkar. Çocuk yaş grubunda bu oranlar daha düşüktür. Bruselloz mezbahe çalışanlarına solunum yolu ile geçebilir. Respiratuar trakt tutulumu basit bir soğuk algınlığı nitelikte eden tablodan bronşit, bronkopnömoni, tek ya da çoğul nodüller, akciğer absesi, miliyer lezyonlar, hiler lenfadenopati ve plevral effüzyona kadar değişen şekillerde görülebilir (4).

#### **II.8.7. Hematolojik Komplikasyonlar**

Brusellozun hematolojik komplikasyonları, hafif anemiden pansitopeniye kadar geniş bir spektrum gösterir (4,89). Anemi, lökopeni ve trombositopeni sık saptanan bulgulardır (4). Pıhtılaşma bozukluklarına bağlı kanama komplikasyonları ve lenfopeni hastalığının şiddetiyle ilgili olarak görülen bulgulardır. Pansitopeni nadir görülmekle beraber olguların %75'inden fazlasında kemik iliğinde granülomlar vardır. Kutanöz purpura ve ciddi trombositopeni kemik iliğinde hemofagositik histiyositler veya antiplatelet antikoları ile birlikte olabilir. Dissemine intravasküler

28  
koagülasyon (DIC) çok nadir de olsa görülebilir (6). Hematolojik komplikasyonlar *B.melitensis* infeksiyonlarında daha sıktır (90,91).

#### **II.8.8. Kutanöz Komplikasyonlar**

Deri lezyonları brusellozlu hastaların %5-10'unda görülen çoğu geçici nonspesifik lezyonlardır. Raş, papül, ülser, eritema nodosum, peteşi, purpura, vaskülit, granümatöz cilt vaskülitisi şeklinde değişik lezyonlardır (67,92).

#### **II.8.9. Oküler Komplikasyonlar**

Üveit, optik nörit, papil ödem, korneal tutulum gibi çeşitli oküler komplikasyonlar brusellozlu olgularda bildirilmiştir. Üveit genellikle geç manifestasyondur. Noninfeksiyöz immün cevap olarak değerlendirilir, topikal ve sistemik kortikosteroid tedavisine yanıt verir. Endojen metastatik endoftalmit nadir olarak bildirilmiştir. Vitreus humordan *Brucella* izole edilmiştir (67,93).

#### **II.8.10. Diğer Komplikasyonlar**

Tiroidit, adrenal yetmezlik ve uygunsuz Antidiüretik Hormon

(ADH) salınımı, artroplasti ile ilişkili infeksiyon, fokal süperatif yumuşak doku abseleri nadir görülen diğer komplikasyonlardır (67,82).

## II.9. TANI

Tanıda hastanın hikayesi, fiziki muayenesi, radyolojik bulgular ve laboratuvar verileri gereklidir. Kesin tanı mikrobiyolojik yöntemlerle elde edilen bulgular sonunda konulabilmektedir.

*Brucella* cinsi bakterilerin hücre içi paraziti olması, insanlarda klasik belirtileri dışında her türlü hastalığı taklit etmesi, bakteri izolasyonundaki bazı güçlükler, son olarak tipleri alışılmış serolojik ve fizyolojik yollarla birbirinden ayırmanın zorluğu, hastalığın klinik ve serolojik tanısında bazı güçlükleri beraberinde getirmektedir.

29

Rutin laboratuvar incelemelerinde; sıklıkla anemi, lökopeni, lenfomonositoz, nadiren trombositopeni, hemolitik anemi, yaygın intravasküler koagülasyon, pansitopeni şeklinde hematolojik bozukluklar gözlenmektedir. Sedimentasyon hızı ortalama olarak 35-40 mm/h'dir. Karaciğerde sık yerleşim gösterdiklerinden, karaciğer fonksiyon testlerinde yükselmeler saptanabilir. Hastanın yüksek ateşli olduğu dönemde idrarda febril albüminüri, ürobilinojen artışı görülebilir (1).

**Bruselloz tanısında incelenen örnekler:** *Brucella* kültürü yönünden incelenen örneklerin başında kan ve kemik iliği, daha az olarak da dalak ve karaciğer biyopsileri, abse, BOS, eklem, periton ve perikard sıvıları ve idrar örnekleri gelmektedir (7). Kültür için alınan bakteriyolojik örnekler en geç 2 saat içerisinde uygun besiyerlerine ekilmelidir. Eğer bu süre içinde ekimlerin yapılması mümkün olamayacaksa 4-10°C'de korunması gerekmektedir (94).

Serolojik çalışmalar amacıyla en sık alınan örnek ise serumdur. Akut dönemde serolojik çalışmalar için serum örneklerinin hastalığın başlangıcında; iyileşme döneminde ise akut dönemden 21 gün sonra alınması uygundur (94).

Brusellozun kesin tanısında direkt ve indirekt yöntemler kullanılır.

### II.9.1. Direkt Etiyolojik Tanı Yöntemleri:

- A. Kültür yöntemleri ile etkenin izolasyonu.
- B. Moleküler yöntemlerle *Brucella* antijenlerinin ve DNA'sının aranması.

### II.9.2. İndirekt Tanı Yöntemleri:

- A. Tüp aglütinasyon testleri
- B. Hızlı aglütinasyon testleri
- C. ELISA
- 30
- D. Kompleman birleşme testleri
- E. Brucella capt testi
- F. *Brucella* dipositik test
- G. Floresan polarizasyon deneyi
- H. Deri testleri
- İ. Opsonositofajik test
- J. Hayvan deneyleri

### II.9.3 Radyolojik Tetkikler

#### II.9.1. DİREKT ETİYOLOJİK TANI YÖNTEMLERİ:

Bruselloza neden olan suşun kültürden izolasyonu, antijenlerinin ya da nükleer materyallerinin serolojik ya da moleküler tekniklerle gösterilmesi temeline dayanan yöntemlerdir.

##### A. Kültür Yöntemleri İle Etkenin İzolasyonu:

Bakterinin izolasyonu altın standart kabul edilir. Ancak hastalık prevalansının çok düşük olduğu ülkelerde ve bölgelerde etkenin tanınmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır.

Fakültatif hücre içi paraziti olan *Brucella* bakterilerinin kültürden izolasyonu 5-7 gün arasında bir zaman gerektirmektedir. Brusellozun kesin tanısında kan, kemik iliği kültürlerinde bakterinin üremesi esastır. Ekimler çift yapılarak birisi normal atmosfer koşullarında diğeri %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda üretilmelidir. Genelde geç ve güç üreyen bir bakteridir. Et ekstresi, triptoz, glikoz ve tuz içeren ortamlarda bir çok türünün izole edilebilmesine rağmen bir çoğu da tiamin, niasin nikotinik asit, biotin ve serum gibi maddelerin varlığında üreyebilmektedir. *Brucella*'ların üretilmesinde; %5 koyun kanlı agar, çikolatamsı agar, triptikaz soy agar, trypton soya agar, potato infusion agar, serumlu dekstroz agar, gliserol dekstroz agar, brucella agar, columbia agar ve kan kültürü şişeleri kullanılan besiyerlerinden bazılarıdır (7). Castenada besiyeri olarak bilinen nonselektif bifazik besiyeri 31

kan ve diğer vücut sıvılarına da süten *Brucella* izolasyonunda tercih edilir. Tüm temel ortamlar *Brucella* bakterilerinin dışındaki organizmaların üremesini engellemek için antibiyotik ilave edilerek seçici hale getirilebilir. Bu amaçla belirli oranlarda polimiksin, basitrasin, sikloheksimid, nalidiksik asit, nistatin, vankomisin içeren antimikrobik komplekslerinin kullanılması uygun olmaktadır. (95).

*Brucella* türlerinin direkt izolasyonu ve kültürü amacıyla genellikle katı besiyerleri tercih edilmektedir. Katı besiyerlerinin en önemli avantajlarından birisi gelişen bakteri kolonilerinin morfolojisinin incelenmesi ile tanıya katkısı sağlamasıdır. Katı yüzeylerde elde edilmiş kolonileri 1-2 mm çapında, nonhemolitik, şebnem tanesine benzer saydam, küçük, kabarıklık, S tipi kolonilerdir. Yavaş üreyen bakterinin kolonileri 48 saat sonra gözle görülebilir büyüklüğe erişmektedir. Koloniler eskidikçe çapları büyür ve matlaşır.

Kültür pozitiflikleri %3-90 arasında değişmektedir. Yurdumuzda öncelikli antibiyotik kullanımının nedeni ile kandaki bakteri sayısının az olmasından bu oran düşük bulunmaktadır. Bruselloz nedeniyle ortaya çıkan ateşin ikinci gününden sonra kan kültüründen olumlu sonuçlar alınabilmektedir. Olumlu sonuç elde edebilmek için farklı zamanlarda alınan birden fazla kan kültürünün yapılması uygundur. Yapılan kültürlerden alınan pozitif sonuçların oranı yöreden yöreye ve laboratuvarın laboratuvara değişkenlik göstermektedir (94).

Çoğu klinik laboratuvar bugün hızlı izolasyon metodlarını (BACTEC, Du Pont, İzolator vb.) kullanmaktadır. Otomatik kan kültür

sistemleri ile 2 gün gibi kısa sürede üreme saptandığı bildirilmiştir (4). Bakteriyemi bütün hastalarda görülmediği için üreme saptanmayabilir. Hemokültürün başarısız olduğu durumlarda kemik iliği kültürü önerilir. *Brucella* türleri kemik iliği aspiratında kan kültürlerine göre daha çabuk ürer. Brusellozda kemik iliğinde *Brucella*'nın inokulumu kandan yüksektir.

32

Gutozza ve arkadaşlarına göre; antibiyotik kullanmışlarda kan kültürü ile %50 olan izolasyon oranı kemik iliği kültürlerinde %90, antibiyotik kullanmayanlarda kan kültürü ile %75 olan izolasyon oranı kemik iliği kültürlerinde %92.5'e kadar yükselmektedir. Yine bu araştırmacılara göre kemik iliği kültürlerinde 4.32 gün olan üreme zamanı, kan kültürlerinde 6.65 gün olarak bulunmuştur (96).

Bakterilerin izolasyon süresini kısaltmak amacıyla "lisis konsantrasyon yöntemi" de uygulanmaktadır. Bu yöntemde ozmotik basınçla kan hücreleri lisis edilerek hücre içi bakterilerin açığa çıkması sağlanır. Santrifügasyonla yoğunlaştırılan bakteri süspansiyonun agar besiyerine veya kan kültür şişelerine ekilir. Basit, pahalı olmayan, güvenilir ve nispeten çabuk sonuçlanan bir yöntemdir (4,97).

**Hastalık materyaline göre değişmek üzere *Brucella*'ların ilk izolasyonlarında dikkat edilmesi gerekli başlıca kurallar şunlardır (3):**

- 1- Ekimler çift yapılarak birisi normal atmosfer şartlarında, diğeri %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda tutulmalıdır.
- 2- Kan, BOS gibi kontamine olmayan materyaller için selektif olmayan sıvı besiyerleri tercih edilir.
- 3- Kontamine materyal ekiminde katı, plak şeklinde selektif besiyerleri kullanılmalı ve nemli ortam *Brucella*'ların hızla varyasyonuna yol açtığından, plaklar kuru olmalıdır.
- 4- İlk izolasyonda bakteriler yavaş ürediklerinden 30 gün hatta daha uzun süre bekletilmeden kültürler olumsuz diye atılmamalıdır.
- 5- Genellikle hastalığın i ve gen ya da aktivasyon dönemlerinde, ateşin yüksek olduğu dönemde izolasyon oranı artar.
- 6- Kan aseptik şartlarda antikoagülanlı tüplere alınarak derhal ekim yapılmalı veya hasta başında antikoagülanlı besiyerlerine doğrudan ekim yapılmalıdır.

33

- 7- Selektif olmayan sıvı besiyerleri kullanılır. 50-100 ml'lik bir besiyerine, 5-10 ml kan ekilmeli ve ekimlerden birisi CO<sub>2</sub>'li ortama konulmak üzere çift yapılmalıdır.
- 8- Sıvı ekimlerde 2. günden itibaren 2-3 günde bir katı besiyerlerine aktarmalar yapılarak 37°C'de bekletilip koloni oluşup oluşmadığı izlenir. Bu pasajlar da 2-3 hafta bekletilmelidir.
- 9- Casteneda yöntemi bu bakımdan en pratik yöntem olup, 120 ml'lik dört köşe şişelerde kullanılacak besiyerinin agar katı şekli yatık olarak, ayrıca 20-30 ml aynı besiyerinin sıvı şeklini bulunduracak şekilde hazırlanırlar. Kan ekimi sıvı kısma yapılır. 2-3 günde bir eğmek suretiyle katı besiyeri yüzeyine bulaştırılıp yine dik durumda 37°C'de bekletilerek

koloni oluşmaz izlenir.

## **B. Moleküler Yöntemlerle *Brucella* Antijenlerinin ve DNA'sının Aranması:**

Brusellozun semptom ve bulgularında spesifik olmadığı için kesin tanı *Brucella* bakterilerinin ya da nükleik asitlerinin izolasyonu ile ya da spesifik immun yanıtın kanıtlanması ile yapılır (98). Bruselloz tanısını daha güvenilir kılmak amacıyla PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemlerinden yararlanılmaktadır (99). İnsan brusellozunun tanısında PCR, kan kültürlerinden daha duyarlı ve serolojik testlerden daha spesifiktir (100). Tüm materyaller için uygun bir testtir ayrıca tanı amaçlı kullanılabileceği gibi, tiplendirmede, epidemiyolojik çalışmalarda da kullanılır (101). Brusellozlu olduğu klinik olarak tanımlanan olgularda geleneksel kültür yöntemleri ile PCR testi karşılaştırılmış ve PCR'nin konvansiyonel kültürlerle göre çok daha fazla duyarlı ve hızlı olduğu, laboratuvarında çalışanları riske atmamak için bu testin kullanılmasının yerinde olacağı, brusellozun merkezi komplikasyonlarının tanısı için yararlı bir araç olacağı bildirilmektedir (102).

Son yıllarda brusellozun hızlı tanısında kemik iliği aspirasyonu ve periferik kan örnekleri ile PCR çalışmalarının çok olumlu sonuçlar verdiği

34 bildirilmiştir. Ancak bu çalışmaların antibiyotik kullanımından önce yapılması önerilmektedir (103). Bir çok PCR temelli yöntem, *Brucella*'nın tanısında başarı oranını artırmıştır. PCR, akut-kronik hastalarda yüksek özgüllük ve duyarlılıkta hızlı sonuç verebilir. Ana genetik hedef olarak *Brucella* BCSP-31 geni ve 16S-23S rRNA gen bölgeleri kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada; üç farklı *Brucella* gen bölgesi PCR metodu ile karşılaştırılmış, F4/R2 gen bölgesi ile yapılan PCR metodunun insan brusellozunun tanısında halen en duyarlı ve güvenilir yöntem olduğu vurgulanmıştır (100,104). PCR sadece hastalığın tanısında değil, tedaviyi takiben ve relapsların da erken saptanmasında çok yararlı bir teknik olarak bildirilmiştir (105). Konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında PCR, kısa zamanda sonuç alınabilme avantajının yanında kontaminasyon riski ve pahalı olma gibi dezavantajlara sahiptir (106).

### **II.9.2. İNDİREKT TANI YÖNTEMLERİ:**

Bu yöntemler hastalığa neden olan mikroorganizma ya da bu mikroorganizmanın antijenlerine organizmanın verdiği bağışık yanıt sonucu oluşan antikorların serolojik olarak belirlenmesi; antijenlere karşı organizmada ortaya çıkan aşırı duyarlılığın (allerji) "deri testleri" ile araştırılması ile yapılan tanı yöntemleridir. Serolojik çalışmalarda gözlenen zorluklar ise; bakterinin hücre içi paraziti olması, blokan antikorların sıklığı, bazı bakteriler ile çapraz reaksiyonlar veriyor olması, bazı olgularda antikor yanıtının oluşmamasıdır (4,94).

#### **A. Tüp Aglutinasyon Testleri**

1-Standart Tüp Aglutinasyon Testi (Wright Aglutinasyon Testi):

Brusellozun tanısında kullanılan standart serolojik test, Standart Tüp Aglutinasyon (STA) testidir. Bu test ilk kez Wright tarafından 1897 yılında



uygulanmıştır (4). Bazı laboratuvarlarda eleme testi olarak önce Rose Bengal testi kullanılır. Eğer bu test pozitif ise Wright Aglutinasyon testi ile titrasyon belirlenir. STA testinde 1/160 ve üzerindeki sulandırımelerde aglutinasyon görülmesi veya titrede 3 hafta içinde 4 kat artış olması tanı

35

koydurucudur. *B.abortus* 99S kökenlerinin kolonilerinden alınan bakterilerin ısı ile öldürülmesi fenollü süspansiyonundan elde edilen antijenin (*B.abortus* 1119 kökeni de kullanılmaktadır), hasta serumunun ardışık dilüsyonlarıyla karşılaştırılması esasına dayanır. Bu antijen her üç tipe karşı oluşmuş antikorlar tarafından aglutine edilir. İnkübasyonu takiben, tüpteki sıvının berrak olması, aglutinasyonun tüpün dibinde yaygın bir kümeleşme şeklinde görülmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilir (3,68). STA testinin düşük spesifitesi diğer proteinlerle olan çapraz reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Romatoid faktör aktivitesi ile oluşan IgM ise STA testindeki spesifite düşüklüğünden sorumludur. STA testi uygun tedavi protokolünün seçiminde ve hastalığın seyrini göstermede önemli olan farklı immünglobulin sınıflarını ayırt edemez. Akut bruselloz belirti ve bulguları olan hastaların taranmasında uygun bir testtir (65).

Normal olarak bazı kimselerin serumlarında 1/80-1/100 titresinde *Brucella* aglutininleri bulunabileceğinden, hasta serumları 56°C'de 30 dakika inaktive edilirse bunların etkisi önlenir. Üç haftalık bir hastalık süresinden sonra, hastaların %97'sinden fazlasında infeksiyon serolojik olarak saptanabilir. Uygun antibiyotik tedavisine karşı olguların %5-72'sinde anlamlı STA testi titrasyonları iki yıla kadar yüksek kalabilmektedir (3).

*2-Rivanol veya 2-Merkaptoetanol Testi:*

Klasik STA testinde saptanan immünoglobulinlerin hangi sınıftan olduğu belirlenemez. Hastalığın ilk haftasında IgM sınıfta antikorlar ortaya çıkar, 3 ayda en yüksek düzeye ulaşır, sonra yavaşça azalır ve kaybolurlar. IgG antikorları ise hastalığın başlangıcından 3 hafta sonra yükselmeye başlar, 6-8 haftada en yüksek düzeye ulaşır, uzunca bir süre kanda bulunabilirler. Yalnızca IgG antikorlarının titresini ortaya çıkarabilmek için, IgM'in 2-merkapto-etanol'e duyarlılığından faydalanılır. Aglutinasyon testinde kullanılan sulandırıcıları içine 0.05 M 2-merkapto-etanol (rivanol de kullanılabilir) konulduğunda, hasta serumundaki IgM antikorları

36

etkisizleşeceğinden, alınan sonuç yalnız IgG antikorlarına ait olacaktır. Rivanol veya 2-merkapto-etanol IgM'deki bisülfid köprülerini kırarak antikorları depolimerize eder ve bunların aglutinasyon etkinliklerini yok ederler. Bu maddelerle işlem görmüş serumlarla yapılan aglutinasyon deneylerinin yine olumlu bulunması IgG antikorlarına bağlı olup hastalığın süregenleştiği anlamına taşır. Önce olumlu iken bu işlemlerden sonra olumsuz aglutinasyon elde edilmesi ise ilk aglutinasyonun, IgM antikorlarına bağlı olduğu anlamına taşır. Bruselloz tedavisinden sonra IgG antikorlarının yükselen titrelerle çıkması olgunun kronikleştiği ve tedavinin sürdürülmesi gerektiği anlamına taşır (1).

### 3-Coombs Testi:

Klinik olarak bruselloz belirtileri olduğu halde yapılan aglütinasyon deneylerinin olumsuz olması, brusellozda sık rastlanan bir durumdur. Olay antikorların antijenlere bağlandıkları halde aglütinasyon reaksiyonu oluşturmasını engelleyen mekanizmanın bulunmasından doğmaktadır (3). Bloke edici ya da blokan antikorlar olarak tanımlanan bu tip immunoglobulinlerin varlığında, antijen-antikor birleşmesi gerçekleşmekte, fakat aglütinasyon meydana gelmemektedir. Bu antikorlar Coombs serumu (antihuman globulin) kullanılmak suretiyle ortaya çıkarılır. Ortama ilave edilen coombs reaktif, antikorlar arası köprüler kurarak gerçek seropozitifliğin ortaya çıkmasını sağlar (3).

Özellikle kronik brusellozda bazen antikorlar blokan tiptedir. Blokan antikorlar IgG ya da IgA yapısındadır. İlk kez Griffiths tarafından 1947'de tanımlanmıştır. Smooth LPS'e karşı oluşan antikorlardır ve IgG1 ve IgG2 izotipleridir (68).

Coombs testinde STA testinde aglütinasyon görülmeyen tüpler, tuzlu su ile üç defa yıkanıp yeniden süspansiyon yapıldıktan sonra, her tüpe bir damla Coombs serumu damlatılır. 37°C'de 24 saat bekletildikten sonra değerlendirilir. Böylece blokan antikorların etkisi ortadan kaldırılmış olur.

37

Bu testin özellikle düşük titrede antikor içeren veya negatif sonuç alınan kronik olguların belirlenmesinde önemi vardır (1,3,107).

Hastalığın erken ve geç dönemlerinde, yüksek antikor titrelili serumlarda daha sık olmak üzere prezon olayı ve diğer bloke edici fenomenler nedeniyle yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir. Prezon olayı, blokan antikorlara bağılgelişebileceği gibi, ortamda eşit miktarlarda antijen ve antikor bulunmamasına bağılı olarak da ortaya çıkabilir. Özellikle serum yüksek titrede antikor içerdiği zaman aglütinasyon düşük serum dilüsyonlarında maskelenebilir. Bu duruma "antikor fazlalığı zonu" veya "prezon" adı verilir. Ancak serum örnekleri sulandırılmalarının oldukça ileri oranlarda tutulması ile prezon olayı önlenemez (3).

### **B. Hızlı Aglütinasyon Testleri:**

Bu testlerde bakterinin konsantrasyonu belli değildir. Alınan pozitif sonuçların STA yöntemiyle doğrulanması gerekir. Hızlı aglütinasyon testleri lam aglütinasyon testi, kart test, mikroaglütinasyon testi ve Rose Bengal testleridir (108).

*1-Lam Aglütinasyon testi:* Tam kan kullanılarak yapılan lam aglütinasyon deneyi (SPOT testi), özellikle kitle taramalarında yoğun *Brucella* bakterisi süspansiyonundan hazırlanmış antijenin bir damlası üzerine, parmak ucundan alınan bir damla kan damlatıldığında, aglütinasyonun görülmesi prensibine dayanır. Hayvan brusellozunun epidemiyolojik olarak taranması amacıyla kullanılır. Bu testin özgüllük ve duyarlılığı tüp dilüsyon metoduna benzer olsa da, çevresel koşullardan etkilenmesi nedeniyle tercih edilmez (3).

*2-Mikroaglütinasyon testi:* Safranin O gibi çeşitli boyalarla boyanan *Brucella* antijenlerinin kullanıldığı, daha kısa inkübasyon zamanı ve daha az

antijen gerektiren bir testtir (4).

38

**3-Kart Test:** Esas olarak hayvan serumunu test etmek için hazırlanmış, tamponlanmış, boyanmışbakteri süspansiyonunun kullanıldığı makroskopik bir aglütinasyon testidir (109).

**4-Rose Bengal Testi:** *B.abortus* S99 suşundan hazırlanan ve özel teknikle Rose Bengal boyastile boyanan, tamponlu tuzlu sudaki yoğun *Brucella* antijeni kullanılarak yapılan tek sulandırılmış bir lam aglütinasyon testidir. Tampon pH'sı 3,65'e ayarlandığından serumdaki IgM'lerin aktivitesi önlenmişolacağından, bu test ile tespit edilen antikorların büyük kısmıIgG yapısındadır (68).

Endemik bölgelerde tüm ateşli hastalara uygulanmalıdır. Özellikle akut brusellozisi çabuk tanımlamaktadır. Çalışılmasıkolay, hızlıve duyarlı bir tarama testidir; düşük oranda yalancıpozitif sonuç alınabilir. *Vibrio cholerae*, *Yersinia* infeksiyonlarında, lenfoma ve tüberkülozda yalancı pozitiflik görülebilir (4).

### **C. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Son zamanlarda, özgül lipopolisakkarit antijenlerinin kullanılması esasına dayanan ELISA yöntemleri uygulamaya giren serolojik testler arasındadır (110).

ELİSA oluşturulan antijen-antikor kompleksine, enzim ile işaretli anti gammaglobulin bağlanarak ve enzimin etkilediği substratın eklenmesi ile renk oluşumuna dayanan bir testtir. Bu testte enzimle işaretli monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Akut ve kronik bruselloz tanısında immünglobulin sınıflarının profilini veren hızlı, yüksek duyarlıklive özgül güvenilir bir yöntemdir (108).

Mesleki risk taşıyanlar ve subklinik vakaların tespitinde ELİSA ile belirlenecek spesifik IgM araştırmasıuygun bulunmuştur (108). Akut bruselloz vakalarında önce IgM'lerin, sonraki dönemde IgM yanında IgG1, IgG2 ve IgG3 alt gruplarının tespiti, kronik vakalarda ise IgG4 ve IgA'ların

39 çoğunlukta olduğu ELİSA ile gösterilmiştir (63,108). Tedavi sonrası iyileşmeden sonra ELİSA ile IgG ve IgA titrelerinde artıştespit edilmesi relaps teşhisi için iyi bir göstergedir (63). Nörobruselloz vakalarında da BOS'da antikor aramak için ELİSA testi uygun bir yöntemdir (94).

ELISA brusellozda tarama testi olarak da kullanılabilceği bildirilen, serolojik tanıda alternatif yöntemlerden biridir (11). Yalancıpozitif ELISA sonuçları, *B. abortus* lipopolisakkaridi ile bovin IgM'lerinin nonspesifik bağlanması sonucu ortaya çıkmaktadır.

Yeni geliştirilen ELISA testleriyle tanıda duyarlılık ve özgüllük artırılmaya çalışılmaktadır. Son zamanlarda geliştirilen "Competitive Enzyme Immunoassay (CELISA)"ın özgüllüğü %96.5-100; duyarlılığıise %94.8-100 arasında bulunmuştur. Lucero ve arkadaşlarıbu bilgiyi verdikleri çalışmalarında indirek ELİSA (IELISA) testinin en duyarlıtest olduğunu ancak bu testin yorumlanmasında problemler olduğuna, örneğin *Y.enterocolitica* O:9 ile infekte olgularda yanlışpozitif sonuç verebileceğine

dikkat çekmektedirler (112). CELISA'da infeksiyon bölgelerinden elde edilen çoklu *Brucella* türlerine karşı tek oluşan monoklonal antikorlar aranabilmektedir. Bu deneyde kullanılan monoklonal antikorlar bakteriye ait S-LPS için özgülüdür. CELISA, S-LPS'nin O polisakkaritine karşı oluşan özgül IgM antikorlarının aranması esasına dayanan bir testtir. Bu antikorlar çapraz reaksiyon veren antikorlarla yarıştır. İnsan brusellozunun tanısında uygun bir test olduğu ve bir doğrulama testi olarak kullanılabilceği bildirilmektedir (112).

#### **D. Kompleman Fiksasyon Testi (KFT):**

Hastalığın ileri evrelerinde ya da kronik hastalıkta predominant olan IgG antikorlarının tanısında önemli olmaktadır. KFT en sensitif ve en spesifik konvansiyonel serolojik yöntem olması nedeniyle bruselloz tanısında doğrulama testi olarak kabul edilmektedir. STA testi sonuçlarının yetersiz kaldığı veya negatif olduğu inkübasyon dönemi, geç kronik safha

veya aşılmalarda KFT önemli tanı yöntemidir (101,113). Fakat antikomplementer aktivitenin ortaya çıkması, kompleman gibi kararsız reaktiflerin kullanılması, hastalığın başlangıç dönemlerinde kompleman fiksasyonuna yanıtın tespit edilmesindeki yetersizlik ve teknik gereksinimler gerektirmesi gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir (94).

#### **E. Brucellacapt Testi**

Son zamanlarda geliştirilen bu test yöntemi, immunocapture aglütinasyon tekniği temeline dayanmaktadır. Kuyucuklarda gerçekleşen bir Coombs'lu *Brucella* aglütinasyon testidir. Pahalı, kompleks ve zaman alıcı bir testtir (114,115).

#### **F. Brusella Dipsitick test**

Smits ve arkadaşları 1999'da piyasada bulunmayan insan brusellozu tanısı için hızlı bir dipsitick yöntemi geliştirmişlerdir. Bruselloz şüpheli fakat Rose Bengal negatif hastalardan alınan serumlarda sensitivite %89, spesifite %98,6 oranlarında bulunmuştur (116).

*Brucella* spesifik IgM antikorlarının araştırılması için yararlıdır.

Dipsitick ısıya dirençli antijen santrifugasyon ile hücre kalıntılarının kaldırılması ile takiben 95°C'de ısıtılmış su ile yıkanmış *B.abortus* 119-2 sıvı kültürü bir nitroselluloz banda belli bir çizgi olarak uygulanmıştır. Bir internal kontrol için anti human IgM antikorları ayrı bir çizgi olarak nitroselluloza kaplayarak uygulanmıştır (68). Uygun laboratuvar şartları olmayan yerlerde ve kırsal bölgede hızlı tanı testi olarak kullanılabilir (117).

#### **G. Floresan Polarizasyon Deneyi:**

Bu deneyin esası florokrom ile işaretli çözelti içindeki az miktardaki bir çözünür antijen ile antikoruyla kompleks oluşturmuş antijen molekülü arasında rotasyonal farklılıklara dayanmaktadır. Küçük molekül, hızlı şekilde rastgele döner ve ışık hızla depolarize olur. Daha büyük olan kompleks molekül ise daha yavaş döner ışığın depolarizasyonu yavaşlar.

41

Depolarizasyondaki değişim hızı ölçülebilmektedir. Floresan depolarizasyon deneyi reaksiyona girmeyen reaktiflerin ortamdan

uzaklaştırılmasını gerektirmeyen bu nedenle hızlı, taşınabilir ekipmanla yapılabilen laboratuvar ve sahada uygulanabilir olan homojen bir deneydir. Floresan depolarizasyon deneyinin sığır, domuz, koyun, keçi ve bizon gibi hayvanların brusellozunun serolojik tanısında uygun olduğu kabul edilmektedir (118).

#### **H. Deri Testleri:**

Brusellozda allerjik deri testleri, tamamlayıcı test olarak yararlı olmaktadır. En sık kullanılanı ise “Brucallergen” deri testidir. Brucallergen bir nükleoprotein kompleksi olup deri içine şırınga edildikten sonra 24 saat içerisinde enjeksiyon yerinde kızarıklık, ödem ve endurasyon oluşması, kişinin *Brucella* bakterilerine karşı aşırı duyarlı olduğunu gösterir. Hastaların bir çoğunda bu test pozitif ise de, negatif olması bruselloz tanısından uzaklaştırmaz (7).

#### **H. Oponositofajik Test:**

*Brucella* infeksiyonlarının serolojik tanısında, oponositofajik testten de faydalanılır. Bu test hasta serumundaki fagositozu kolaylaştıran ve opsonin adı verilen antikörlerin ortaya çıkarılması için kullanılan bir testtir. Tanı hasta serumu, lökosit ve bakteri süspansiyonunun birbirleri ile karıştırılmasından sonra, 35°C’de 15 dakika inkübe edilmesi ve buradan hazırlanarak giemsa ile boyanan preparatın incelenmesi ile konur. Bir lökosit tarafından fagosite edilen ortalama bakteri sayısı, fagositik indeksi verir. Bu sayı 10 veya daha fazla ise test pozitifdir (7).

#### **İ. Hayvan Deneyleri**

Kobaylar *Brucella* infeksiyonlarına karşı duyarlıdır. İncelenecek materyal periton içi, kas içi veya konjunktivanın da dahil olduğu herhangi bir yol ile inoküle edilir. Deneyde iki kobay kullanılır. Bunlardan birisi inokülasyondan 3 hafta, diğeri 6 hafta sonra öldürülür. Otopside; dalak,

karaciğer ve lenf bezlerinde miliyer nekrotik odaklar görülür. Periton içi inokülasyondan sonra erkek kobaylarda orşit gelişir, gebe dişi kobaylar ise düşük yaparlar (7).

#### **II.9.3. Radyolojik Tetkikler**

İskelet sistemi tutuluşu olan olgularda direkt filmler yararlıdır. Radyolojik değişiklikler en çok vertebra korpuslarının kenarlarında dikkat çekicidir. İntervertebral aralıklarda daralma %90 vakada saptanabilir. Vertebral osteomyelit, sakroileit veya artrit şüphelenilen olgularda ilgili bölge bilgisayarlı tomografi veya magnetik rezonans ile görüntülenmelidir. Organ ve eklem tutulumlarının belirlenmesinde radyoizotop maddeler ile yapılan sintigrafik tetkikler tanıkoydurucudur. Tc 99m MDP (metilen difosfonat) kemik sintigrafisi bruselloza bağlı osteoartikuler komplikasyonların teşhisinde oldukça kullanışlıdır (119,120).

#### **II.10. BRUCELLA SUŞLARININ İDENTİFİKASYONU**

Kuşkulu kolonilerden Gram preperatı, katalaz ve oksidaz testleri yapıldıktan sonra, katı besiyerlerine saf kültür ekimleri yapılır. İdentifikasyon için saf kültürlerden aşağıdaki incelemelerin yapılması uygundur (3). Bunlar;

1-Üreaz deneyi

3- H<sub>2</sub>S üretimi

4-Thionin ve bazik fuksin içeren agarlarda üreme

5-Monospesifik antiserumlarla aglütinasyon

6-Faj tiplemesi

Üreaz deneyi için Crytensen üre agar besiyerinin yüzeyine saf kültürlerden çizgi ekimleri yapılarak araştırılır. *B.suis* 15-20 dakikada, *B.abortus* 2 saatten sonra üreaz etkinliği göstererek besiyerinin rengini pembeleştirirler. *B. melitensis* saatler sonra olumlu veya olumsuz sonuç verir.

43

H<sub>2</sub>S üretimini gözlemlemek için bir yatk besiyerine ekim yapılır.

Tüp tıkaçının arasına tüp içine kurşun asetatlıkağıt şerit sarkıtılır. Her gün kağıdın oluşan H<sub>2</sub>S etkisi ile siyahlanıp siyahlaşmadığı incelenir.

Siyahlaşmış ise bir yenisini ile değiştirilip kültür yeniden inkübe edilir. Bu suretle bakterilerin kaç gün H<sub>2</sub>S yaptıkları bulunur. *B.suis* üç gün ve daha çok, *B.abortus* iki gün, *B.melitensis* az miktarda ve bir gün H<sub>2</sub>S yapar.

Boya inhibisyon deneyinde amaç thionin ve fuksin gibi boyaların çeşitli konsantrasyonları içeren besiyerlerinde *Brucella*'ların üreyebilme özelliklerinin araştırılarak tür ayrımı yapılmasıdır. *Brucella* bakterilerinden boyaları içeren katı besiyerlerine plak yüzeylerine çizgi ekimleri yapılır.

Çift ekimlerden birisi CO<sub>2</sub>'li ortamda diğeri normal atmosferde 37°C'de inkübe edilir. 48 saat sonra üremelerinin olup olmadığına bakılır. *B.abortus* yalnız thionin tarafından inhibe olurken, *B.melitensis* her iki boyada da inhibisyona uğramadan üremektedir. *B.suis* ise bazik fuksin tarafından inhibe olurken thioninden etkilenmeden üremesini sürdürmektedir (4).

Monospesifik anti serumlarla aglütinasyonu araştırmak için, reaksiyon sonuçları bir dakika içinde oluşan aglütinasyon durumuna göre okunarak değerlendirilmektedir. Lam aglütinasyonları yapılarak *B.melitensis*'i diğeri ikisinden ayırt etmek mümkün iken, *B.suis*'i *B.abortus*'dan ayırmak olanaksızdır. *Brucella*'ların sık antijen varyasyonları nedeniyle antiserumlarının elde edilmesi zordur. Bu konuda referans laboratuvarı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün Kopenhag Serum Enstitüsü'dür.

*Brucella*'ları özgün olarak eriten bakteriyofajların kullanımında hem genus hem de tür düzeyinde identifikasyon için yararlıdır. *Brucella*'lara karşı faj ilk defa Rusya'da Drozewkina ve Vershilova tarafından lizojenik suşve gübreden elde edilmiştir. Konakçıtalanına dayanarak *Brucella* fajları 6 grupta sınıflandırılmıştır. Grup 1: T bilisi (Tb), Grup 2: Firenze (Fi), Grup 44

3: Weybridge (Wb), Grup 4: Berkeley (BK<sub>0</sub>, BK<sub>1</sub>, BK<sub>2</sub>), Grup 5: R, R/O, R/C, Grup 6: İzatnagar (Iz). Tb, Fi, Wb ve Berkeley fajları R formundaki *Brucella*'lar için litik değildir. R/C fajı S formundaki *Brucella* türleri ile *B.melitensis* ve *B.suis* dahil bazı *Brucella* türlerinin R kolonilerine de litik etki göstermektedir. T bilisi fajı rutin test dilüsyonunda (RTD) *B.abortus*'un S kültürlerini lizise uğratır. Fakat *B.suis* ve *B.melitensis* kültürleri

etkilenmez. *B.suis* RTD'nu 10<sup>4</sup> katlı konsantrasyonda kısmen lizise uğramasına rağmen *B.melitensis* T bilisi fajitle hiçbir şekilde lizise uğramaz (121,122,123).

## **II.11. TEDAVİ**

**II.11.1. Destek Tedavisi:** Hastaların özellikle tedavilerinin ilk haftasını yatakta geçirmeleri önerilir. Çünkü bu dönemde endotoksinlerin fazlaca açığa çıkması, ateşlerinin yükselmesine neden olabilir. Bu devrede ağır yemeklerden kaçınmalı, sindirimi kolay ve sulu gıdalar verilmelidir. Hasta evli bir kişiye eşi de mutlaka kontrolden geçirilmeli, sağlıklıysa eşinin tedavisi süresince seksüel ilişki yasaklanmalıdır (7). Destek tedavisi, antimikrobik tedaviye cevabı kolaylaştırır ve iyileşmeyi hızlandırır (124).

### **II.11.2. Özgül Tedavi:**

Brusellozda antimikrobik kemoterapi semptomları ortadan kaldırır, komplikasyonları azaltır ve nüksleri önler.

Brusellozun özgül tedavisinde en önemli problem, etkenin intrasellüler üreme özelliği ve kanda nadiren serbest halde bulunmasıdır. İn vitro çalışmalarda birçok antibiyotiğin *Brucella* suşlarına karşı etkili olmasının belirlenmesine karşın, bu bakterilerin makrofaj ve RES hücrelerine yerleşmeleri nedeniyle in vivo tedavide sorunlar yaşanmaktadır. Bu hücrelerin içinde yüksek konsantrasyonlara ulaşamayan antibiyotiklerle yapılan tedavi başarısız olmaktadır. Bruselloz tedavisinde kullanılan antibiyotik mutlaka makrofajların içine girebilmeli ve bakterisi etkili olmalıdır.

45

Bruselloz kombine antimikrobiyal kullanımının gerekli olduğu bir hastalıktır. İlaçların hepsi ancak kombinasyon halinde kullanılır. Tek antibiyotik ile yapılacak tedavi hem bakterinin antibiyotiğe direnç kazanmasına ve hem de tedavinin başarısız olmasına neden olabilmektedir. Tedavi rejiminin seçimi ve antimikrobiyal tedavinin süresi fokal hastalığın varlığına ve hastanın yaş, gebelik, allerji, renal yetmezlik gibi şartlarına bağlı olarak seçilmelidir (78).

*Brucella* bakterilerine in vitro etkili antibiyotikler; tetrasiklinler, beta laktamlar, aminoglikozitler, klaromfenikol, eritromisin, trimetoprim sulfometaksazol, rifampisin ve fluorokinolonlardır (124,125). In vitro etkili olmalarına karşın penisilinler, klaromfenikol, eritromisin, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler in vivo tedavide etkisiz olduklarından kullanılmamalıdır. Bazı araştırmacılar tarafından imipenem'in de etkili olduğu gösterilmiştir (4,124).

Brusellozda tedavi DSÖ'nün önerdiği şekilde ikili, bazı durumlarda da üçlü kombine antibiyotik uygulanması şeklindedir. DSÖ 1981 yılında brusellozun tedavisinde tetrasiklin + streptomisin kombinasyonunu önermiştir. Tetrasiklin 2 gr/gün oral (6 saat ara ile 500 mg) 6 hafta, + streptomisin 1 gr/gün intramuskuler tek doz 21 gün süreyle verilmiştir. Bu tedavi uzun zaman kullanılmıştır; tedavide başarı elde edilmekle birlikte bilinen komplikasyonlara ve relapslara da sıkça rastlanmıştır (125). 1986 yılında ise yine DSÖ tarafından hastalığın tedavisinde

değişiklik yapılmış ve rifampisin + doksisisiklin kombinasyonu önerilmiştir. Uzun etkili bir tetrasiklin türevidir olan doksisisiklin 200 mg/gün oral (ikiye bölünmüş dozlar halinde) + rifampisin tek doz 600-900 mg/gün oral olarak 6 hafta süreyle kullanılmaktadır (27).

46

### II.11.3. Bruselloz Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler

**1-Tetrasiklinler:** Tetrasiklinler *Brucella* 'lara karşı güçlü in vitro aktiviteye sahiptirler. En yeni tetrasiklinler doksisisiklin ve minosiklin'dir. Tetrasiklinler MİK'nın düşük olması, aktivitelerinin klinikte kullanılan tüm antibiyotiklerden daha yüksek olması ve intrasellüler penetrasyonlarının çok iyi olması sebebiyle tedavide ilk seçilecek antibiyotiklerdir (6,126).

Doksisisiklin, tetrasiklinler içerisinde yağda en fazla eriyen yapıda olması, tok olarak 12 saat arayla kullanılabilmesi, kan-beyin bariyerini en iyi geçebilen tetrasiklin grubu olması ve lökositler içine daha fazla nüfuzu sebebiyle tercih edilmektedir (4,6,126).

Gebelerde ve dişlerde kalıcı sarı lekelenmelere yol açması sebebiyle 8 yaş altındaki çocuklarda kullanılmazlar (124).

**2-Aminoglikozitler:** Aminoglikozitler *Brucella* 'ya karşı orta derecede aktiviteye sahiptirler. Tetrasiklinlerle kombinasyonları sinerjistik etki yapar. Brusellozda üzerinde en fazla çalışılan aminoglikozit streptomisin'dir (6).

Lokomotor sistem semptomları olan vakalarda streptomisin'in daha etkili olduğu bildirilmektedir. Doksisisiklin/streptomisin ve doksisisiklin/rifampin kombinasyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada her iki rejimin de 45 gün süreyle uygulandığında eşdeğer etkinlikte olduğu saptanmış, ancak doksisisiklin/streptomisin kombinasyonunun spondilit gibi komplikasyonların varlığında daha etkili olduğu bildirilmiştir (1,46,127).

Streptomisin 8. sinir üzerine toksik etkiye sahip olduğundan, tedavi sırasında ototoksite yan etkisi akılda tutulmalıdır, ayrıca gebelerde de kontrendikedir (124).

Diğer aminoglikozitlerden, özellikle gentamisin'in in vitro olarak tetrasiklinlere yakın oranda başarı gösterdiği bildirilmektedir. Ayrıca

netilmisin, spektinomisin ve amikasin'in de in vitro olarak aktif oldukları gösterilmiştir (6,124).

**3-Rifampisin:** Bruselloz tedavisine daha geç girmekle beraber, major ilaçlar arasında yer almaktadır. Tek başına kullanımında %2-10 oranında başarı şansı bulunmuştur (124). Gebelerde ve çocuklarda kullanılabilir (4,124). Doksisisiklin ile kombine edilmesi bruselloz tedavisinde en popüler tedavi şekli durumundadır.

In vitro aktivitesi iyi olup, hayvan deneylerinde iyi neticeler alınmıştır. Oral kullanım avantajı vardır. PMNL ve makrofajlar içine iyi penetre olur, intrasellüler ortamda tetrasiklin gibi bakterisidal aktivitesini sürdürür (128).

**4-Trimetoprim/Sulfametaksazol:** Özellikle çocuk popülasyonunda tercih edilen, ancak tek başına kullanımında %40-50'ye varan nüks oranı



bildirilen bir ilaçtır (124). İn vitro olarak yeterince etkili bulunmakla beraber, klinik çalışmalar ancak kısmen etkili olduğu yönündedir (6). Brusellozlu gebelerde ve 8 yaş altındaki çocuklarda kullanılabilir. Kombinasyon şeklinde kullanılması gerekli bir ilaçtır (1,4).

**5-Fluorokinolonlar:** *Brucella*'ya karşı in vitro yüksek aktiviteye sahip ilaçlardır. İntrasellüler penetrasyonlarının iyi olmasavantajları olmakla beraber, tek başlarına kullanımlarında yüksek relaps oranları sebebiyle, ancak kombine tedavi rejimlerinde yer verilmelidir (4,124,128). Siprofloksasin ve ofloksasin, bruselloz tedavisinde etkili bulunan kinolonların başında gelir (124,128).

Fluorokinolonlar *Brucella* türlerine in vitro oldukça etkilidir, ancak bu ajanlar ile monoterapi sonuçları iyi değildir. Ofloksasin 400 mg/gün oral tek doz + rifampin 600 mg/gün oral tek doz kombinasyonu ile 6 haftalık

48 tedavi sonuçları, doksisisiklin + rifampisin kombinasyonu ile eşdeğer bulunmuştur (125).

**6-Sefalosporinler:** İn vitro olarak *Brucella*'ya en etkili sefalosporin seftriakson'dur. Tek başlarına kullanımlarında tedavi başarısızlığı ve relaps yüksekliği sebebiyle kombine tedavi şeklinde kullanılmalıdır. Nörobruselloz vakalarında ve gebelerde kullanılabilirler (4,129).

**7-Penisilinler:** Ampisilin ve amoksisilin in vitro etkili olmakla beraber, in vivo etkinlikleri konusunda yeterli çalışma yoktur. Bununla beraber, akut brusellozlarda etkili bulunmuşlarsa da, tedaviye cevap vermeyen veya relaps gösteren vakalar sebebiyle tercih edilmezler. Yine subakut ve kronik brusellozda etkili bulunmamışlardır (126,130).

**8-Diğer Antibiyotikler:** Klaromfenikol etkili bulunmakla beraber, relaps oranı yüksek bildirilmiştir (126). Yeni antibruselloz ajan olarak azitromisin %92-100, klaritromisin %85 oranında etkili bulunmuştur (131). Erişkinlerde tedavi seçenekleri arasında özellikle fokal hastalığı olanlarda doksisisiklin + streptomisin kombinasyonunun az bir üstünlüğü olmakla birlikte, eşdeğer etkinliği ve kullanım kolaylığı nedeniyle doksisisiklin + rifampisin kombinasyonu başlangıç tedavisi olarak önerilmektedir.

**İmmünoterapi:** Bir immünomodülatör olan levamizol'un kronik bruselloz tedavisinde antibiyotiklerle kombinasyonu ise ümit verici bulunmuştur. Levamizol'un bu etkisi muhtemelen T hücre fonksiyonunu, hem de monosit fagositozunu artırmasıyla ilişkilidir (124,126).

Brusellozda uygun tedavi verilen hastalarda tedavide başarısızlık ya da relaps sıklığı çok düşüktür (132). Bazı özel durumlarda klasik tedavi protokollerinde değişiklikler yapılması gereklidir. Başlıcaları şunlardır;

**8 yaşından küçük çocuklarda tedavi:** Bu grupta tetrasiklinler ve enjektabl ilaçlardan kaçınılmalıdır. Çocuklarda etkili bulunan tedavi rejimlerinden birisi trimetoprim/sulfametoksazol + rifampisin kombinasyonunun 6 hafta süreyle verilmesidir (133). Alternatif rejim olarak 3 hafta trimetoprim/sulfametoksazol + 5 gün gentamisin tedavisi önerilmektedir (134).

**Nörobruselloz tedavisi:** Nörobruselloz tedavisinde kullanılan ilaçlar BOS'a iyi geçebilmeli ve tercihen bakterisid olmalıdır. Tetrasiklinlerden doksisisiklin yağıda eridiğinden BOS'a geçişi daha iyidir. Streptomisin kanbeyin bariyerini yeterince aşmamaktadır (126). Rifampisin ise BOS'a iyi geçmesi sebebiyle her kombinsyonda kullanılmasigereken bir ilaçtır (1,126).

Nörobruselloz tedavisinde en uygun tedavi rejimi ve süresi konusunda fikir birliğı yoktur. Fikir birliğı olmasa da doksisisiklinle beraber rifampisin, trimetoprim-sulfametoksazol, seftriakson, streptomisin, gentamisin, siprofloksasin'in 2'li veya 3'lü olarak 3-9 ay süreyle kullanılması önerilmektedir. Bu süre belirti ve bulgulara göre bireyselleştirilebilir. Ancak genellikle BOS proteini normale dönünceye, hücre sayısı100/mm<sup>3</sup> ve altına ininceye, ayrıca BOS'da antikor titresi azalmaya başlayıncaya kadar tedaviye devam edilir (6,135).

Kortikosteroidler, antimikrobiyal tedavinin yanında beyin ödemi gidirmek, yapışıklıklarıönlemek amacıyla bu hastalara verilebilir, ancak klinik rolü tam olarak gösterilememiştir (85).

**Endokardit tedavisi:** Uygun tedavi yapılmayan hastalar kaybedilir.

En sık kullanılan kombinasyon doksisisiklin + streptomisin + rifampisin veya doksisisiklin + streptomisin + trimetoprim-sulfametoksazol'dür. Buna rağmen olguların hemen hemen hepsinde kapak replasmanıgerekmektedir (136).

50

**Gebelikte tedavi:** Belirli hayvan türlerinin aksine, *Brucella* insanlarda abortusa neden olmamaktadır. Bazen sepsis nedeniyle prematüre eylem ve fetüs atılımolabilir. Gebelerde tetrasiklin türevleri bruselloz tedavisi için seçilmemelidir. Aminoglikozidlerin gebelerde risk kanıtları olduğu unutulmamalıdır. Tedavide rifampisin, trimetoprim-sulfametoksazol ve seftriakson'dan oluşan ikili kombinasyonlar yapılabilir. Tedavi süresi 4-6 hafta arasında değişmektedir (137,138).

**Relapslarda tedavi:** İlk kullanılan kombinasyonun yinelenmesi yeterli olmaktadır.

**Kronik olgularda tedavi:** Antimikrobiyal tedaviye bir immünmodülatörün (Levamisol) eklenmesi veya 4-6 haftalık kombinasyon tedavisinden sonra 6 ay süre ile düşük doz oksitetrasiklin kullanımı önerilmektedir.

## II.12. BRUSELLOZDA KORUNMA VE KONTROL

İnsan brusellozunun kontrolü, hastalığın evcil hayvanlar arasında eliminasyonu ile sağlanabilir. Hastalığın kontrolünde dikkat edilecek konular aşağıda özetlenmiştir (139).

### A. Koruyucu Önlemler :

1. Halk (özellikle turistler) çiğya da pastörize edilmemişsüt ve süt ürünlerinin tüketilmemesi konusunda eğitilmelidir.
2. Çiftçiler, mezbaha çalışanları, et işletme tesislerinde çalışanlar, kasaplar hastalığın bulaşyollarıkonusunda eğitilmeli; potansiyel infekte hayvanların ölüleri ve çıkartılarıile temas edilmemeli ve bunlar uygun şekilde uzaklaştırılmalı, tesislerde düzenli havalandırma yapılmalıdır.

3. Avcılar, yaban domuzları ile temas sırasında koruyucu önlemlerin alınması (eldiven, giysi gibi) ve bu hayvanların gömülmesi konusunda eğitilmelidir.

51

4. Çiftlik hayvanları arasında serolojik testler ile, inek sütünde ELISA ya da ring test ile hastalığın araştırılması, infekte hayvanların ayrılması ve/veya öldürülmesi gereklidir. Domuzlar arasında infeksiyon varsa genellikle hayvanın öldürülmesi gerekir. İnfeksiyon prevalansının yüksek olduğu bölgelerde, genç keçi ve koyunların *B.melitensis* canlı attenüe Rev-1 suşu ile, sığırların ise *B.abortus* 19 suşu ile aşılama önem taşır. Ancak bu aşılama programının bir kaç yıl boyunca sürdürülmesi gereklidir. Domuzlar için henüz bir aşı geliştirilememiştir.

5. Etkinliği klinik çalışmalar ile desteklenmemesine karşın, 19 suşu ya da Rev-1 suşu aşılarla aksidental olarak temas eden bireylere doksisisiklin 100 mg oral günde iki kez ile kombine olarak, rifampin 600-900 mg günde tek doz 21 gün süreyle verilmelidir; konjonktival inokülasyonlar için profilaksi 4-6 hafta sürdürülmelidir.

6. Koyun, keçi ve ineklerden elde edilen süt ve mandıra ürünleri pastörize edilmelidir. Pastörizasyon olanağı yoksa kaynatma da etkilidir.

7. Hayvanların düşük materyali; plasenta, fetüs ve genital akıntılar ile temas ederken dikkat edilmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır. Kontamine alanlar dezenfekte edilmelidir.

#### **B. Hasta ve Temas Ettiği Yakın Çevresinin Kontrolü :**

1. Hastalık ülke içi bildiri zorunlu bir hastalıktır; yerel sağlık müdürlüğüne bildiri yapılmalıdır.

2. Dışortama drene olan lezyonlar mevcutsa gerekli önlemler alınmalıdır.

3. Pürülan akıntılar dezenfekte edilmelidir.

4. Karantina gerekli değildir.

5. Temas edenlere aşı gerekmez.

6. Temas ve infeksiyon kaynakları araştırılmalıdır; infekte evcil keçi, domuz ve sığırlar ile inek ve keçilerden elde edilen çiğ süt ya da mandıra

52 ürünleri önem taşımaktadır. Şüpheli hayvanlar test edilmeli ve test sonucu pozitif çıkanlar uzaklaştırılmalıdır.

7. Spesifik tedavi uygulanmalıdır.

#### **C. Epidemik Önlemler :**

İnfeksiyonun yayılmasında en önemli araç olan infekte hayvanlardan elde edilen çiğ süt ya da süt ürünleri, özellikle peynir gibi maddeler araştırılmalıdır. Suçlanan şüpheli ürünler toplanmalı; üretimi durdurulmalı ve pastörizasyondan emin olmadan dağıtımını önlenmelidir. Uluslararası ticaret ve taşımacılıkta evcil hayvanlar ve hayvansal ürünlerin kontrolü gereklidir.

53

### **III. GEREÇ VE YÖNTEM**

Çalışmamızda 2004-2006 yılları arasında Afyon Kocatepe

Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında kan kültürlerinden izole ve tanımlanmış ve çevre illerden gönderilen 50 *Brucella* suşu incelenmiştir. İzolatlar elde edildikten sonra tiplendirmeleri yapılarak -80°C'de Skim Milk Powder (Oxoid,UK) ve %20 gliserol içeren Tryptone Soy Broth (Oxoid,UK)'da saklandı. Stoklanan izolatlar çalışma günlerinde çözümlenilip kanlı agar (Oxoid,UK) ve çikolata agara pasajlandı.

Kontrol suşu olarak CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)'nin önerileri doğrultusunda (140) *B.abortus* 03036, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 standart suşları kullanıldı.

### **III.1. İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON**

Hastalardan ateşli oldukları dönemde alınan kan kültürleri BACTEC 9050 (Becton Dickinson,USA) otomatik cihazında inkübasyona bırakıldı. BACTEC cihazında pozitif uyarılan kan kültür şişelerinden kanlı agar ve çikolata agara iki ayrı pasaj yapıldı. Pasajlardan birisi aerob, diğeri % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Besiyerlerinde 48 saatlik inkübasyon sonucunda üreyen yaklaşık 2 mm çapında küçük, yuvarlak, saydam, düzgün kenarlı, hemolizsiz, pigmentiz, şebnem tanesine benzeyen kolonilerden Gram boyama yapıldı. Mikroorganizmaların Gram (-) kokobasiller oldukları görüldü. Gram (-) basiller katalaz, oksidaz pozitif ise *Brucella* cinsi olarak adlandırıldı. Daha sonra üreaz aktiviteleri, CO<sub>2</sub> ihtiyaçları, H<sub>2</sub>S üretimi, thionin ve bazik fuksin içeren besiyerindeki üreme özelliklerine göre türleri belirlendi. Fuksinli ve thioninli besiyerlerinin her ikisinde de üreyen, CO<sub>2</sub> ihtiyacı göstermeyen,

H<sub>2</sub>S oluşturmayan ya da ilk 24 saat süresince oluşturan, üreaz aktivitesi değişken olan suşlar *B.melitensis* olarak tanımlanmış edildi

#### **III.1.1.Gram Boyama Yöntemi:**

Katı besiyerinde üremiş kolonilerden öze ile alınarak lam üzerinde bir damla serum fizyolojik içerisinde süspansiyon edildi. Hazırlanan preparatlar havada kurumaya bırakıldı ve kuruduktan sonra alevde tespit edildi.

-İlk aşamada lamenin her tarafını kaplayacak şekilde kriyстал violet damlatılıp 1 dakika bekletilen preparat daha sonra çeşme suyunda yıkandı.

-İkinci aşamada preparat üzerine lugol damlatılarak yine 1 dakika bekletildi ve yine çeşme suyunda yıkandı.

-Üçüncü aşamada preparat üzerine %96'lık etil alkol damlatılarak 30 saniye bekletilip yıkandı.

-Son aşamada ise preparat üzerine zıt boya olarak sulu fuksin damlatılıp yine 1 dakika bekletildi ve yıkandı.

Preparatlar havada kurutulup immersiyon objektifi ile incelendi.

#### **III.1.2. Katalaz ve Oksidaz Reaksiyonları:**

Çikolata agarda üremiş olan kolonilerden öze ile alınıp bir lam üzerine bırakıldı. Üzerine bir iki damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılıp, tahta eküvyon çubukla karıştırıldı. Gaz kabarcıklarının oluşumu katalaz reaksiyonu pozitif olarak değerlendirildi.

Oksidaz deneyi için hazır Oksidaz test stripleri (Oxoid,UK) kullanıldı. Test stribi yüzeyine kanlıagarda üremişolan koloniler temas ettirilip, 5-30 saniye bekledikten sonra mor-siyah renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

55

### **III.1.3. CO<sub>2</sub>Gereksinimleri:**

Ekimler çift yapılarak birisi %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda (Gaspack sys,Oxoid,UK) diğeri aerobik ortamda inkübe edildi. Böylece *B. abortus*'un üremesi için uygun mikroaerofilik ortam sağlanmaya çalışıldı.

### **III.1.4. Hidrojen Sülfür Üretimi (H<sub>2</sub>S):**

Petride üreyen suşlara ait kolonilerden iğne uçlu öze ile tek koloni alınarak yatık tryphtone soy agar (Oxoid,UK)'a ekim yapıldı. Kurşun asetatlıkağıt (Sigma,USA) besiyerine kesinlikle temas etmeyecek şekilde tüple tıpa arasına sarkıtılarak yerleştirildi.

Kurşun asetatlıkağıtlitüpler 37°C'de inkübe edildi. İlk 2-3 saatte, daha sonraki saatlerde ve günlerdeki H<sub>2</sub>S üretimine bağlıolarak kağıtlardaki kararım süreleri kontrol edildi ve kararım zamanlarıkaydedildi.

### **III.1.5. Kurşun AsetatlıKağıt Hazırlanması:**

a-50 ml kaynar saf su içerisinde 10gr kurşun asetat eritildi.

b-7 mm en ve 5 cm boyunda kesilen emici süzgeç kağıtlarıbu eriyiğin içine bandırıldı.

c-Petri kutularına kapağı açık olarak yerleştirilip etüvde kurutulduktan sonra genişağızlıkapaklıbir şişede saklandılar.

### **III.1.6. Boyalarla Birlikte Üreme:**

Kanlıagar ya da çikolota agarda üreyen *Brucella* bakterileri kolonilerden fuksinli ve thioninli besiyerlerine birbirine paralel çizgi ekimleri yapıldı. Ekimler çift yapılarak, petriyer %5-10 CO<sub>2</sub>'li ve aerob koşullarda 48 saat süreyle inkübe edildi. Sonuçlar üreme durumuna göre değerlendirildi.

56

### **III.1.7. Üreaz Deneyi:**

Üre Agar (Oxoid,UK)'a *Brucella* kolonilerinden iğne öze ile tek koloni alınarak çizgi ekim yapıldı. 37°C'de inkübe edildi, birer saat aralıklarla besiyerindeki renk değişimi kontrol edildi.

## **III.2. KULLANILAN BESİYERLERİ**

### **Kanlıagar**

Tripticase veya peptone 15gr

Soya enzimatik hidrolizatı 5gr

NaCl 5gr

Agar 15gr

Distile su 1000 ml

pH:7.3

Sıcak suda kaynatılarak eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterillendi ve 50°C'ye soğutuldu. Defibrine koyun kanından 70 ml eklendi. Kartıştırılarak steril petri kaplarına kalınlıkları4 mm olacak şekilde döküldü.

### **Çikolatamsıagar:**

Proteose peptone 7,5 gr

Polypeptone 7,5 gr  
Nişasta (buğday) 1 gr  
NaCl 5 gr  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 gr  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 gr  
Agar 10 gr  
Distile su 1000 ml  
pH. 7.3

Sıcak suda kaynatılarak eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilendi. 70°C'ye soğutulup içine 50-100 ml defibrine koyun kanteklendi. Karıştırılarak steril petri kaplarına kalınlıkları 4 mm olacak şekilde döküldü.

57

### **Crystensen Üre agar:**

a- Üre baz eriyiği:

Peptone 1 gr  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 gr  
NaCl 5 gr  
D-Glucose 1 gr  
Üre 20 gr  
Fenol kırmızısı 12 mg  
Saf su 100 ml  
pH: 6.8

b-Agar eriyiği

Agar 15 gr  
Distile su 900 ml

Önce üre baz eriyiği hazırlandı. Agar eriyiği sıcak suda kaynatılarak eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilendi. 50°C'ye soğutulup soğutulup üre baz eriyiği ilave edildi. Karıştırılıp steril cam tüplere 4-5 ml döküldü.

### **Brucella agar:**

Tripticase veya Triptone 10gr  
Peptone veya peptamine 10gr  
Dextrose 1 gr  
Yeast extract 2gr  
NaCl 5 gr  
Sodium bilsulfite 0.1 gr  
Agar 15gr  
Distile su 1000 ml  
pH. 7

Karıştırıldı, kaynar su banyosunda eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilendi. 50°C'ye soğutulup steril petri kaplarına kalınlıkları 4 mm olacak şekilde döküldü.

58

### **Thioninli Besiyerleri:**

1:100.000, 1:50.000, 1:25.000 oranlarında bu boyayıtıçeren plak besiyerlerini hazırlamak için içlerinde 100 ml brucella agar (Becton Dickinson and Company, USA) bulunan üç balon joje alındı. Besiyerleri

ısıtılarak eritildi ve 48°C'de tutulurken birinci balona thionin saf sudaki %0.1'lik eriyiğinden 1ml, ikinci balona 2 ml ve üçüncü balona 4 ml eklendi ve karıştırılıp ve hemen steril petri plaklarına döküldü.

#### **Fuksinli Besiyerleri:**

1:100.000 ve 1:50.000, 1:25.000 yoğunluklarında hazırlamak için aynı şekilde içlerinde 100 ml brucella agar bulunan iki balona 48°C'de tutularak %0.1'lik fuksin eriyiğinden birinci balona 1 ml, ikinci balona 2 ml eklendi, karıştırılıp steril petri plaklarına döküldü.

### **III.3. KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER**

1. Doksisiklin (DOX)
2. Rifampisin (RF)
3. Streptomisin (SM)
4. Siprofloksasin (CIP)
5. Trimetoprim/sulfametoksazol (TMP/SMZ)
6. Azitromisin (AZM)

#### **III.3.1. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması:**

Mikrodilüsyon ve Agar dilüsyon testleri için; üretici firmalardan temin edilen Ciprofloxacın HCl (Bayer, Spain), Streptomycin sulfate salt (Sigma, Germany), Rifampicin (Fluka, Germany), Doxycycline HCl (Fako, Türkiye), Trimetoprim/sulfametoksazol (Fluka, Germany), Azitromycin Dihydrate (Sanovel, Türkiye) antibiyotik tozları uygun çözücülerde çözüldükten sonra, CLSI (140) önerileri doğrultusunda dilüsyonlar hazırlandı.

59

#### **Tablo IV: Kullanılan Antibiyotiklerin Çözücü ve Sulandırıcıları**

##### **Antibiyotik Çözücü Sulandırıcı**

Doxycycline HCL Distile su Distile su  
Rifampicin Metanol Distile su  
Streptomycin sulfate salt Distile su Distile su  
Ciprofloxacın Distile su Distile su  
TMP/SMZ Dimethylsulfoxid Distile su  
Azitromycin Dihydrate Dimethylsulfoxid Distile su

### **III.4. MİKRODİLÜSYON**

Mikrodilüsyon yöntemi için, U tabanlı mikrodilüsyon plakları kullanılmıştır. Antibiyotiklerin dilüsyonları hazırlanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Hacim(ml) x Konsantrasyon (µg/ml)

Ağırlık (mg) = \_\_\_\_\_

Antibiyotik potensi (µg/ml)

*Inokulumun Hazırlanması:*

24 saatlik saf bakteri kültüründen otomatik eşele göre 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde direkt koloni süspansiyonu yöntemiyle inokulum hazırlanıp son inokulum konsantrasyonu 5x10<sup>5</sup> koloni/ml olacak şekilde 1/100 sulandırım yapıldı.

Steril U tabanlı mikropoplaklarda tüm kuyucuklara 100 µl Brucella Broth (Difco™ & BBL™, USA) dağıtıldı. İlk kuyucuklara hazırlanan antibiyotik stok solüsyonundan 100 µl konuldu ve birinci kuyucuktan

itibaren 10. kuyucuğa kadar 0.06-32 µg/ml arasında seri dilüsyonlar hazırlandı. Son iki kuyucuktan 11. kuyucuk bakteri üremesini değerlendirmek için 12. kuyucuk ise besiyeri kontrolü amacıyla kullanıldı. 5x10<sup>5</sup> cfu/ml olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonundan 12. hariç tüm kuyucuklara 5'er µl dağıtıldı. Pleytlerin üzeri steril şeffaf bantlarla

60 örtüldü ve 35°C'lik etüv ortamında 48 saat inkübe edildi. 48 saatin sonunda üreme görülmeyen en düşük konsantrasyon MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyon) değeri olarak belirlendi.

### III.5. AGAR DİLÜSYON

Brucella agarda her antibiyotiğin 0.06-64 µg/ml arasındaki konsantrasyonları iki kat artan seri dilüsyonlar halinde hazırlandı. Antibiyotikli besiyerleri testlerin yapıldığı günler taze olarak hazırlanıp kullanıldı. Kontrol için antibiyotiksiz besiyerleri hazırlandı. Daha sonra bu besiyerlerine %0.9'luk serum fizyolojik içerisindeki 0.5 McFarland (10<sup>8</sup> cfu/ml)'lık bakteri süspansiyonundan öze ile 10'ar µl'lik ekimler yapıldı. Ekim için 90 mm çaplı, 4 mm kalınlığında besiyeri içeren petri plakları kullanıldı ve her plakta 4 şuşçalışıldı. Plaklar 35°C'lik etüvde 48 saat inkübe edildikten sonra değerlendirildi. Bakteri üremesinin inhibe olduğu en düşük konsantrasyonlar antibiyotiklerin MİK değeri olarak belirlendi.

### III.6. E test YÖNTEMİ

Çalışmada CIP, SM, RF, DOX, TMP/SMZ ve AZM (AB Biodisk, Sweden) E test stripleri kullanıldı. Antibiyotik stripleri çalışma anına kadar -20 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce 30 dakika oda ısısında bekletildi. Her *Brucella* izolatı için, katıbesiyerinde üreyen kolonilerden 0.5-1 McFarland'lık süspansiyon hazırlandı. Süspansiyondan 10 µl alınarak %5 koyun kantilave edilmiş 4 mm kalınlığında 90 mm'lik Mueller Hinton Agar (Oxoid, UK) plaklarına eküvyon ile yayıldı. Her plağa birbirine ters yönde 2 strip yerleştirildikten sonra pleytler 35°C aerobik ortamda 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üretici firma ve CLSI önerileri doğrultusunda (141), üremenin inhibe olduğu ve sribi kestiği noktadaki değer MİK olarak belirlendi. Her üç test yönteminde MİK sınır değerleri için diğer zor üreyen bakteriler (*H. influenzae* gibi) (142) için kullanılan değerler esas alındı.

61

## IV. BULGULAR

Bruselloz ön tanısıyla izlenen çevre illerde ve hastanemizde tanı konulan hastaların kan kültürlerinden izole ve identifiye edilen suşların tamamı *B. melitensis* olarak tanımlandı. Bu suşlara rifampisin, doksisisiklin, streptomisin, siprofloksasin, azitromisin ve trimetoprim/sulfametoksazol içeren antimikrobiyal ilaçlarla, üç yöntem kullanılarak antibiyotik duyarlılık testi yapıldı; agar dilüsyon, mikrodilüsyon ve E test.

Rifampisin için agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin her üçünde MİK aralığı 0.5-2 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerleri 1 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 2 µg/ml olarak bulundu (Tablo V).

Doksisisiklin için agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin



her üçünde MİK aralığı 0.064-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerleri 0.25 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 0.5 µg/ml olarak bulundu (Tablo V).

Streptomisin için agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin her üçünde MİK aralığı 0.5-2 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerleri 1 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 2 µg/ml olarak bulundu (Tablo V) .

Siprofloksasin için agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin her üçünde MİK aralığı 0.125-1 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerleri 0.25 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 0.5 µg/ml olarak bulundu (Tablo V) .

Azitromisin için agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin her üçünde MİK aralığı 0.5-8 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri agar dilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemlerinde 4 µg/ml olarak, E test yönteminde ise MİK<sub>50</sub> değeri 2 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 4 µg/ml olarak bulundu (Tablo V) .

62

Trimetoprim/sufametoksazol için agar dilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemlerinde MİK aralığı 2-8 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 4 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değeri 8 µg/ml, E test yönteminde ise MİK aralığı 0.064-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 0.25 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değeri 0.25 µg/ml olarak bulundu (Tablo V).

**Tablo V:** Antibiyotiklerin Ortalama Değerleri, MİK Aralıkları, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> Değerleri

**Antibiyotik Ortalama değerleri**

**MİK aralığı (µg/ml)**

**MİK<sub>50</sub> (µg/ml) MİK<sub>90</sub> (µg/ml) *B.abortus* (Kontrol)**

**MİK Değerleri**

**(µg/ml)**

**DOX<sub>M</sub>**

**DOX<sub>A</sub>**

**DOX<sub>E</sub>**

0.25± 0.14

0.27± 0.14

0.22± 0.14

0.064-0.5

0.064-0.5

0.064-0.5

0.25

0.25

0.25

0.5

0.5

0.5

0.25

0.25

0.25

**RF<sub>M</sub>**

**RF<sub>A</sub>**

**RF<sub>E</sub>**

1.21± 0.50

1.22± 0.45

1.05± 0.43

0.5-2

0.5-2

0.5-2

1

1

1

2

2

2

1

1

1

**SM<sub>M</sub>**

**SM<sub>A</sub>**

**SM<sub>E</sub>**

1.18± 0.46

1.38± 0.58

1.09± 0.44

0.5-2

0.5-2

1

1

1

2

2

2

1

1

1

**CIP<sub>M</sub>**

**CIP<sub>A</sub>**

**CIP<sub>E</sub>**

0.37± 0.18

0.36± 0.18

0.37± 0.16

0.125-1

0.125-1

0.125-1

0.25

0.25

0.25

0.5

0.5

0.5

0.25

0.25

0.125

**TMP/SMZ<sub>M</sub>**

**TMP/SMZ<sub>A</sub>**

**TMP/SMZ<sub>E</sub>**

5.88±2.08

5.32± 2.08

0.21± 0.12

2-8

2-8

0.064-0.5

4

4

0.25

8

8

0.25

4

4

0.25

**AZT<sub>M</sub>**

**AZT<sub>A</sub>**

**AZT<sub>E</sub>**

3.57± 1.87

3.58± 1.96

2.35± 1.69

0.5-8

0.5-8

0.5-8

4

4

2

4

4  
4  
4  
4  
2

M: Mikrodilüsyon, A: Agar dilüsyon, E: E test

Suşların tamamında elde edilen MİK değerleri CLSI'nın güç üreyen bakterilerden olan *Haemophilus* türleri için belirlediği sınır değerler dikkate alındığında (142);

Her üç test yöntemiyle de doksisisiklin, siprofloksasin, streptomisine karşı suşların tümü duyarlı bulundu (Tablo VI).

63

Trimetoprim/sulfametoksazole karşı ise BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy)'nin (183) *Haemophilus influenzae* için belirlediği MİK zon aralıklarına göre değerlendirildiğinde, her üç test yönteminde de suşların tümü duyarlı bulundu (Tablo VI).

Rifampisine karşı mikrodilüsyon testinde suşların %74'ü duyarlı, %26'sı orta duyarlı, agar dilüsyon testinde suşların %76'sı duyarlı, %24'ü orta duyarlı, E test yönteminde suşların %86'sı duyarlı, %14'ü orta duyarlı olarak bulundu (Tablo VI).

Azitromisine karşı mikrodilüsyon testinde suşların %90'ı duyarlı, %10'u dirençli, agar dilüsyon testinde suşların %90'ı duyarlı, %10'u dirençli, E test yönteminde suşların %96'sı duyarlı, %4'ü dirençli bulundu (Tablo VI).

Çalışmamızda testler arasındaki uyum değerlendirildiğinde;

Streptomisin, siprofloksasin, doksisisiklin, trimetoprim/sulfametoksazol için mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri arasındaki uyum %100, agar dilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %100, mikrodilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %100, her üç test yöntemi arasındaki uyum da %100 olarak bulundu.

Rifampisin için mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri arasındaki uyum %78, agar dilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %82, mikrodilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %84, her üç test yöntemi arasındaki uyum ise %74 olarak bulundu.

Azitromisin için mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri arasındaki uyum %100, agar dilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %96, mikrodilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %44, her üç test yöntemi arasındaki uyum ise %94 olarak bulundu.

64

**Tablo VI: Yöntemlere Göre Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları**

**Antibiyotik Mikrodilüsyon (%)**

**S I R**

**Agar dilüsyon (%)**

**S I R**

**E test (%)**

**S I R**

**DOX** 100 (50) - - 100 (50) - - 100 (50) - -

**RF** 74 (37) 26 (13) - 76 (38) 24 (12) - 86 (43) 14 (7) -

**SM** 100 (50) - - 100 (50) - - 100 (50) - -

**CIP** 100 (50) - - 100 (50) - - 100 (50) - -

TMP/SMZ 100 (50) - - 100 (50) - - 100 (50) - -  
AZT 90 (45) - 10 (5) 90 (45) - 10 (5) 96 (48) - 4 (2)  
S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli  
65

## V. TARTIŞMA

Bruselloz primer olarak evcil hayvanların bir hastalığı olmakla beraber Akdeniz havzası, Arap yarımadası ve Güney Amerika başta olmak üzere bir çok ülkede toplum sağlığını olumsuz yönde etkileyen bir infeksiyon hastalığıdır (143). Ülkemiz de bu endemik bölgelerin içerisinde yer almaktadır. Özellikle Ankara, Konya, Güneydoğu Anadolu'da Diyarbakır ve Urfa yörelerinde yaygındır (144).

Türkiye'de bruselloz morbiditesi oldukça yüksek olmasına rağmen, mortalitesi düşük bir infeksiyon hastalığıdır (1). Daha çok kırsal kesimde, hayvancılıkla uğraşanlarda, mezbahe işçilerinde, kasaplarda, veterinerlerde ve ayrıca laboratuvar çalışanlarında; bu arada çiğ süt içme ve taze peynir yeme alışkanlığı olanlarda görülmektedir (3,4).

Temelde süt ve süt ürünleriyle hayvanlardan insanlara geçen bu infeksiyon hastalığının tedavi süresi diğer bir çok infeksiyon hastalığının tedavi süresine kıyasla daha uzundur ve kabul görmüş tedavi protokollerine rağmen belli oranlarda relaps görülmektedir (137).

Erişkinde brusellozun DSÖ önerilerine göre klasik tedavisi doksisisiklin + streptomisin veya doksisisiklin + rifampisin kombinasyonu şeklindedir (124, 125). Ancak bu ilaçların yan etkileri ve tedaviden sonra ortaya çıkan relapslar nedeni ile yeni tedavi protokolü arayışlarına girilmiştir. Bunun yanı sıra brusellozlu hastaların ülkemiz koşullarında, infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji uzmanlarına gelmeden önce pratisyen veya başka uzmanlık alanlarındaki hekimlere başvurdukları da bilinen bir gerçektir. Dolayısıyla verilen kısa süreli ampirik tedaviler de infeksiyonun nüks etmesine neden olmaktadır. Klasik sağaltım rejimleri ile yaşanan relapslar, kullanılan antibiyotiklerle ilgili bazı zorluklar nedeniyle brusellozda yeni antibiyotik arayışları sürmektedir (152).

66

Bruselloz tedavisinde DSÖ'nün önerdiği 6 haftalık doksisisiklin + rifampisin kombinasyonu ile relaps oranı çeşitli yayınlarda %8,4-38,8 (127,145,146,147,148) olarak bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Aygen ve ark. (149) doksisisiklin + rifampisin verdikleri 44 hastanın hiç birisinde relaps saptamazlarken, Akova ve ark. (125) bu oranı %3,3, El ve ark. (150) ise %5 olarak bildirmişlerdir.

Bruselloza bağlı ciddi komplikasyonlar yanında, relapsların önlenmesi için uygun ve yeterli tedavi giderek daha çok önem kazanmaktadır (151). İnsan brusellozunda farklı kemoterapi rejimlerinin etkinliklerini saptamak için birçok çalışma yapılmıştır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında diğer besin gereksinimleri karmaşık olan, güç üreyen bazı bakterilerin yanı sıra *Brucella* suşları için duyarlılık testleri henüz standardize edilmemiştir (152). Ayrıca *Brucella* bakterileri ile laboratuvar kaynaklı infeksiyon riski de duyarlılık testlerinin rutinde yapılmasını kısmen engelleyen bir faktördür. Buna rağmen *Brucella* bakterilerinin in vitro

duyarlılık testlerinde dilüsyon yöntemleri en uygun olabilecek yöntemlerdir (152,153).

Rifampisin hücre içine iyi penetrasyonu, kullanım kolaylığı bu antibiyotiği bruselloz tedavisinde ön plana çıkarmıştır. Antibakteriyel etkisini DNA'ya bağlı RNA polimeraz enzimi ile stabil kompleks oluşturarak ve DNA transkripsiyonunu önleyerek göstermektedir.

Wendell ve ark. 1970 yılında agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC_{50}$  değerini 0.3  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulmuşlardır (154). Bosch ve ark. 1986 yılında 95 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon metoduyla yaptıkları çalışmada, rifampisine karşı suşların tümünün 4  $\mu\text{g/ml}$ 'de inhibe olduğunu saptamışlardır (155). Khan ve ark. 1989 yılında 47 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC$  aralığını 0.02-2.5  $\mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{50}$  değerini 0.15  $\mu\text{g/ml}$  ve  $MIC_{90}$  değerini 1.25  $\mu\text{g/ml}$  olarak bildirmişlerdir (156). Rubinstein ve ark. 67

1991 yılında 86 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon ve agar dilüsyon metodları ile yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC_{50}$  değerini 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{90}$  değerini ise 4.0  $\mu\text{g/ml}$  olarak tespit etmişlerdir (157). Garcia-Rodriguez ve ark. 1993 yılında 62 *Brucella* spp. suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC$  aralığını 0.1-4  $\mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{50}$  ve  $MIC_{90}$  değerlerini 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ve 1  $\mu\text{g/ml}$  olarak (158), yine 1994 yılında 59 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC_{90}$  değerini 2  $\mu\text{g/ml}$  olarak bildirmişlerdir (159). Qadri ve ark. 1993 yılında 105 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC$  aralığını 0.12-1.0  $\mu\text{g/ml}$  olarak (160), yine aynı yıl 126 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC$  aralığını 0.12-2.0  $\mu\text{g/ml}$  olarak elde etmişlerdir (161). Martin ve ark. 1999 yılında 105 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC$  aralığını 0.5-1  $\mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{50}$  ve  $MIC_{100}$  değerini ise 1  $\mu\text{g/ml}$  olarak saptamışlardır (162). Yine aynı yıl 160 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları diğer çalışmada rifampisin için  $MIC$  aralığını 0.5-1  $\mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{50}$  ve  $MIC_{90}$  değerlerini ise 1  $\mu\text{g/ml}$  olarak bildirmişlerdir (163). Rolain ve ark. 2000 yılında agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC$  aralığını 0.5-1  $\mu\text{g/ml}$  olarak tespit etmişlerdir (164). Lopez-Merino ve ark. 2004 yılında yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC_{90}$  değerini 2.0  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulmuşlardır (165).

Akova ve ark. 1993 yılında 49 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin için  $MIC$  aralığını 0.03-1.0  $\mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{90}$  değerini 0.5  $\mu\text{g/ml}$  olarak (125), 1999 yılında 43 *B.melitensis* izolatında yine mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları diğer çalışmada ise rifampisin için  $MIC$  aralığını 1-32  $\mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{50}$  ve  $MIC_{90}$  değerlerini 2  $\mu\text{g/ml}$  olarak elde etmişlerdir (166). Erciyes Üniversitesi'nde 1996 yılında 42 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon metodu ile yapılan duyarlılık çalışmasında rifampisin için  $MIC$  aralığı 0.5-4  $\mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{50}$  değeri 1  $\mu\text{g/ml}$  ve  $MIC_{90}$  değeri 2  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulunmuştur (167). Bodur ve ark. 2003

yılında 41 *B.melitensis* suşunda E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin için 0.75 µg/ml değeri ile çalışmadaki en yüksek MİK<sub>90</sub> değerini elde edilmişlerdir (168). Baykam ve ark. 2004 yılında 42 *Brucella* spp. suşunda E test metodu ile yaptıkları çalışmada rifampisin için MİK aralığını 0.19-1.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla 0.75 µg/ml ve 1.0 µg/ml olarak bildirmişlerdir (169). Süleyman Demirel Üniversitesi'nde 2005 yılında 34 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan duyarlılık çalışmasında rifampisin için MİK aralığı 0.5-16 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değeri ise 2 µg/ml olarak saptanmıştır (170). Orhan ve ark. 2005 yılında 16 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada rifampisin için MİK aralığını 0.75-3 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini 1 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 2 µg/ml olarak bildirmişlerdir (171). Kaya ve ark. 2005 yılında 30 *B.melitensis* suşunda E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin için MİK aralığını 0.25-2 µg/ml olarak saptamışlardır (172). Ayaşlığolu ve ark. 2005 yılında 37 *B.melitensis* suşunda E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin için MİK aralığını 0.125-1.5 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 0.75 µg/ml olarak elde etmişlerdir (173). Tanyel ve ark. 2005 yılında 50 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada rifampisin MİK<sub>90</sub> değerini 0.5 µg/ml olarak bildirmişlerdir (174).

Çalışmamızda 50 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin her üçünde rifampisin için MİK aralığı 0.5-2 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerleri 1 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 2 µg/ml olarak saptanmış olup bahsedilen çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bosch ve ark. 1986 yılında 95 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada suşların tamamının doksisisiklinin 0.25 µg/ml konsantrasyonunda inhibe olduğunu saptamışlar, doksisisiklin ve tetrasiklinin *Brucella* suşlarına karşı en aktif antibiyotikler olduklarını bildirmişlerdir (155). Martin ve ark. 1999 yılında 105 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada doksisisiklin için MİK aralığını 0.12-0.25 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>100</sub> değerleri 0.25 µg/ml olarak saptamışlardır (162). Yine aynı yıl 160

69 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada ise doksisisiklin için MİK aralığını 0.12-0.25 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini 0.25 µg/ml olarak bildirmişlerdir (163). Rolain ve ark. 2000 yılında agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada doksisisiklin için MİK aralığını 0.06-0.25 µg/ml olarak saptamışlardır (164)

Erciyes Üniversitesi'nde 1996 yılında agar dilüsyon metodu ile 42 *B.melitensis* suşunda yapılan duyarlılık çalışmasında doksisisiklin için MİK aralığı 0.06-1 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 0.12 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.25 µg/ml olarak tespit edilmiştir (167). Akova ve ark. 1993 yılında 49 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada doksisisiklin için MİK aralığını 0.03-0.5 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 0.5 µg/ml olarak (125), yine 1999 yılında 43 *B.melitensis* izolatında mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları diğer çalışmada doksisisiklin için MİK aralığını <0.125-8 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini <0.125 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini ise <0.125 µg/ml olarak elde

etmişlerdir (166). Bodur ve ark. 2003 yılında 41 *B.melitensis* suşunda E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada doksisisiklini en aktif ajan (MİK<sub>90</sub> 0.064 µg/ml) olarak bildirmişlerdir (168). Baykam ve arkadaşları 2004 yılında 42 *Brucella* spp. suşunda E test metodu ile yaptıkları çalışmada doksisisiklin için MİK aralığını <0.016-0.094 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 0.032 µg/ml ve 0.064 µg/ml olarak saptamışlardır (169). Eşel ve ark. 2004 yılında 74 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon ve E test yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada doksisisiklin için MİK değerini ≤0.125 µg/ml olarak elde etmişlerdir (175). Süleyman Demirel Üniversitesi'nde 2005 yılında 34 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan duyarlılık çalışmasında doksisisiklin için MİK aralığı 0.016-0.512 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değeri ise 0.64 µg/ml olarak saptanmıştır (170). Yamazhan ve ark. 2005 yılında 44 *B.melitensis* izolatında agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada doksisisiklin için MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml olarak tespit etmişlerdir (176). Orhan ve ark. 2005 yılında 16 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada, doksisisiklin için MİK aralığını 0.19-0.125 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini 0.12 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 0.25 µg/ml olarak bildirmişlerdir (171).

Çalışmamızda 50 *B. melitensis* suşunda agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin her üçünde doksisisiklin için MİK aralığı 0.064-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerleri 0.25 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 0.5 µg/ml olarak saptanmıştır. Sonuçlar yapılan benzer çalışmalarla uyumludur. Düşük MİK değerleri nedeniyle doksisisiklinin *Brucella* suşlarına karşı in vitro etkinliği oldukça iyi bir antibiyotik olduğu söylenebilir.

Bosch ve ark. 1986 yılında 95 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada suşların tamamının streptomisin 1 µg/ml konsantrasyonlarında inhibe olduğunu bildirmişlerdir (155). Khan ve ark. 1989 yılında 47 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK aralığını 0.15-5.0 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini 0.6 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değerini 2.5 µg/ml olarak bulmuşlardır (156).

Rubinstein ve ark. 1991 yılında 86 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon ve agar dilüsyon metodları ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK<sub>50</sub> değerini 1.25 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 3.1 µg/ml olarak elde etmişlerdir.

Ayrıca suşlar arasında rastgele birini seçerek ilaçların öldürme hızlarını karşılaştırdıklarında, streptomisin en hızlı öldüren (<12 saat) ilaç olduğunu ve yine streptomisinli kombinasyonlarda (streptomisin + siprofloksasin, streptomisin + minosiklin, streptomisin + rifampisin) öldürme hızının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (157). Qadri ve ark. 1993 yılında 105 *B. melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK aralığını 0.12-2.0 µg/ml olarak bulmuşlardır (161). Garcia ve ark. 1993 yılında 62 *Brucella* spp. suşunda agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK aralığı 0.1-4 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla 2 µg/ml ve 4 µg/ml olarak (158), 1994 yılında 59 *B.melitensis* suşunda yaptıkları çalışmada ise streptomisin için MİK<sub>90</sub> değerini 8 µg/ml olarak saptanmışlardır (159).

Martin ve ark. 1999 yılında 105 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon yöntemi

71

ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK aralığını 4-16 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>100</sub> değerlerini sırasıyla 8 µg/ml ve 16 µg/ml olarak elde etmişlerdir (162). Yine aynı yıl 160 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada ise streptomisin için MİK aralığını 4-16 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini 8 µg/ml olarak bildirmişlerdir (163). Rolain ve ark. 2000 yılında agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK aralığını 1-2 µg/ml olarak tespit etmişlerdir (164). Lopez-Merino ve ark. 2004 yılında 97 *Brucella* spp. suşunda yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK<sub>90</sub> değerini 4.0 µg/ml olarak saptamışlardır (165).

Gür ve ark. 1999 yılında mikrodilüsyon ve E test yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada streptomisin için MİK değerini mikrodilüsyon testinde 256 µg/ml, E test yönteminde ise 128 µg/ml olarak bildirmişlerdir (177). Akova ve ark. 1999 yılında 43 *B.melitensis* izolatında mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK aralığını 0.25-8 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 1 µg/ml ve 2 µg/ml olarak elde etmişlerdir (166). Eşel ve ark. 2004 yılında 74 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK değerini ≤2 µg/ml olarak bulmuşlardır (175). Süleyman Demirel Üniversitesi'nde 2005 yılında 34 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan duyarlılık çalışmasında streptomisin için MİK aralığını 1-32 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değeri ise 2 µg/ml olarak saptanmıştır (170). Orhan ve ark. 2005 yılında E test yöntemi ve Checkerboard metodlarını karşılaştırdıkları sinerji çalışmasında streptomisin için MİK aralığını 0.19-0.125 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini 2 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 2 µg/ml olarak saptamışlardır (171). Kaya ve ark. 2005 yılında 30 *B.melitensis* suşunda E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK aralığını 0.094-1.5 µg/ml olarak bulmuşlardır (172). Ayaşlıgölu ve ark. 2005 yılında 37 *B.melitensis* suşunda E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada streptomisin için MİK aralığını 0.094-0.5 µg/ml olarak bildirmişlerdir (173). Tanyel ve ark. 2005 yılında 50 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada streptomisin MİK<sub>90</sub> değerini 8 µg/ml olarak tespit etmişlerdir (174).

72

Çalışmamızda 50 *B. melitensis* suşunda agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin her üçünde streptomisin için MİK aralığını 0.5-2 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerleri 1 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 2 µg/ml olarak saptanmış olup daha önce yapılan benzer çalışmaların çoğunluğuyla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Kinolonlar içinde ilk tanımlanan nalidiksik asid olmuştur. Ancak bruselloz gibi sistemik infeksiyonlarda oral uygulamadan sonra yeterli serum seviyesine ulaşmadığı, in vitro olarak da *Brucella* türlerine karşı sadece orta derecede (MİK 7.5-10 µg/ml) etkili olduğu için bruselloz tedavisinde kullanılamamıştır (145). Daha sonra geliştirilen fluorokinolonlar, oral biyoyararlanımlarının iyi olması, yüksek doku konsantrasyonlarına ulaşmaları, hücre içine penetrasyonları ve in vitro



olarak *Brucella* türlerine karşı etkileri nedeniyle diğer intrasellüler bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde ilgi çeken antimikrobiyal ajanlar arasında yer almışlardır (150).

Gobernado ve ark. İspanya'da 1984 yılında yaptıkları çalışmada klinik örneklerden izole edilen 68 *B. melitensis* suşunda MİK değerlerini siprofloksasin için 0.5-1 µg/ml olarak bildirmişlerdir (178). Bosch ve ark. 1986 yılında 95 *B. melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada siprofloksasinin 0.5 µg/ml değerlerinde suşların tümünün üremesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (155). Khan ve ark. 1989 yılında ofloksasin, siprofloksasin ve difloksasin gibi kinolonlarla 47 *B. melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin için MİK aralığını 1.25-2.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini 1.25 µg/ml olarak bildirmişlerdir (156).

Rubinstein ve ark. 1991 yılında 86 *B. melitensis* izolatında mikrodilüsyon ve agar dilüsyon metodlarıyla yaptıkları çalışmada minosiklin, streptomisin, trimetoprim/sulfametoksazol, rifampisin ile birlikte siprofloksasin, pefloksasin, ofloksasin, fleroksasin ve sparfloksasini test etmişler, konvansiyonel ilaçlar arasında minosiklini, kinolonlar arasında

73

siprofloksasini en etkili ilaç olarak saptamışlardır. Siprofloksasin için MİK<sub>50</sub> değerini 0.4 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 0.8 µg/ml olarak bildirmişler (157).

Garcia-Rodriquez ve ark. 1994 yılında 59 *B. melitensis* suşunda yaptıkları çalışmada siprofloksasin için MİK<sub>90</sub> değerini 0.5 µg/ml olarak (159), 1995 yılında 120 *B. melitensis* suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin MİK aralığını 0.25-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini 0.25 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değerini 0.5 µg/ml olarak tespit etmişlerdir (179). Martin ve ark. 1999 yılında 160 *B. melitensis* suşunda agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin için MİK aralıklarını 0.25-1 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini ise 1 µg/ml, 2 µg/ml olarak bildirmişlerdir (163). Rolain ve ark. 2000 yılında agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin için MİK aralığını 0.5-1 µg/ml olarak bulmuşlardır (164). Lopez-Merino ve ark. 2004 yılında Meksika'da yaptıkları çalışmada *Brucella* 'lara karşı siprofloksasin için MİK<sub>90</sub> değerini 0.5 µg/ml olarak elde etmişlerdir (165).

Doğanay ve ark. 1992 yılında 8 *B. melitensis* suşunun hepsinin siprofloksasine duyarlı (MİK 0.125-0.250 µg/ml) olduğunu bildirmişlerdir (180). Sümerkan ve ark. 1993 yılında 52 *B. melitensis* klinik izolatında agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları duyarlılık çalışmasında siprofloksasin için MİK<sub>90</sub> değerini 0.5 µg/ml olarak saptamışlar ve kinolonlar arasında siprofloksasin ve ofloksasini pefloksasin ve norfloksasine göre daha etkili bulmuşlardır (181). Erciyes Üniversitesi'nde 1996 yılında 42 *B. melitensis* suşunda agar dilüsyon metodu ile yapılan duyarlılık çalışmasında siprofloksasin için MİK aralığı 0.25-1 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 0.5 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.5 µg/ml olarak saptanmıştır (167). Akova ve ark. 1999 yılında 43 *B. melitensis* izolatında mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin için MİK aralığını <0.125-8 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini 0.50 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini ise 2 µg/ml olarak elde etmişlerdir (166).

Kocagöz ve ark. 2002 yılında en son kullanıma giren kinolonlarıda içine alan yedi farklı kinolon ile 69 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon metodu ile yaptıkları duyarlılık çalışmasında en etkili kinolon olarak sparfloksasin, 74

levafloksasin, siprofloksasin ve ofloksasini bulmuşlardır. Siprofloksasin için MİK aralığı 0.06-2 µg/ml, MİK<sub>50</sub>-MİK<sub>90</sub> değerlerini ise 0.25-0.5 µg/ml olarak bulmuşlardır (182). Bodur ve ark. 2003 yılında 41 *B.melitensis* suşunda E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin MİK<sub>90</sub> değerini 0.25 µg/ml elde edilmişlerdir (168). Baykam ve ark. 2004 yılında E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin için MİK aralığı 0.064-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 0.094 µg/ml ve 0.19 µg/ml olarak saptamışlardır (169). Orhan ve ark. 2005 yılında 16 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin için MİK aralığı 0.064-1 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini 0.5 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 0.5 µg/ml olarak tespit etmişlerdir (171). Ayaşlıoğlu ve ark. 2005 yılında 37 *B.melitensis* suşunda E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin için MİK aralığı 0.064-0.5 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 0.19 µg/ml olarak bildirmişlerdir (173). Yamazhan ve ark. 2005 yılında 44 *B.melitensis* izolatı ile yaptıkları agar dilüsyon çalışmasında siprofloksasin için MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerlerini 0.5 µg/ml ve 2 µg/ml olarak bulmuşlardır (176).

Çalışmamızda 50 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin her üçünde siprofloksasin için MİK aralığı 0.125-1 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerleri 0.25 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 0.5 µg/ml olarak saptanmış olup, bahsedilen çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Garcia-Rodriguez ve ark. 1993 yılında 62 *Brucella* spp. suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada konvansiyonel ilaçlar (streptomisin, rifampisin, tetrasiklin, trimetoprim/sulfametoksazol) ile rifapentini ve eritromisin ile birlikte yeni makrolidleri (roksitromisin, azitromisin, klaritromisin ve diritromisin) agar dilüsyon yöntemiyle test etmişlerdir. Makrolidler arasında azitromisin ile klaritromisin etkili bulunurken, roksitromisin, diritromisin ve eritromisin etkisiz bulunmuştur. Azitromisin için MİK aralığı 0.1-4 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla 1 µg/ml ve 2 µg/ml olarak saptamışlardır. Rifapentin ise rifampisine benzer etki 75

göstermiştir. Bu çalışmada da test edilen konvansiyonel ilaçlara dirençli suş bulunmamıştır (158).

Erciyes Üniversitesi'nde 1996 yılında agar dilüsyon metodu ile 42 *B.melitensis* suşunda yapılan duyarlılık çalışmasında azitromisin MİK aralığı 0.5-32 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 2 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 8 µg/ml olarak saptanmıştır (167). Akova ve ark. 1999 yılında 43 *B.melitensis* izolatında mikrodilüsyon yöntemi ile azitromisin ve eritromisin gibi makrolid ajanları da içine alan çalışmalarında azitromisin için MİK aralığı <0.125-4 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini 1 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini ise 1 µg/ml bulmuşlardır (166). Yamazhan ve ark. 2005 yılında 44 *B.melitensis* izolatı ile yaptıkları agar dilüsyon çalışmasında azitromisin için MİK<sub>90</sub> değerini 32 µg/ml olarak

bildirmişlerdir (176). Orhan ve ark. 2005 yılında 16 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada azitromisin için MİK aralığını 0.25-8 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değerini 1 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 4 µg/ml olarak elde etmişlerdir (171). Çalışmamızda 50 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon, E test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin her üçünde azitromisin için MİK aralığı 0.5-8 µg/ml, agar dilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemlerinde MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri 4 µg/ml, E test yönteminde ise MİK<sub>50</sub> değeri 2 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerleri 4 µg/ml olarak saptanmış olup, yapılan diğer çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bosch ve ark. 1986 yılında 95 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon metodu ile yaptıkları çalışmada suşların tümünün trimetoprim/sulfametoksazolün 0.5/9.5 µg/ml MİK değerinde inhibe olduğunu saptamışlardır (155). Khan ve ark. 1989 yılında 47 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada trimetoprim/sulfametoksazol için MİK aralığını 5.0-25 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini 5.0 µg/ml olarak bulmuşlardır (156). Rubinstein ve ark. 1991 yılında 86 *B.melitensis* izolatında agar dilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile yaptıkları çalışmada trimetoprim/sulfametoksazol için MİK<sub>50</sub> 76

ve MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 3.1 µg/ml ve 6.3 µg/ml olarak saptamışlardır (157). Garcia-Rodriguez ve ark. 1993 yılında 62 *Brucella* spp. suşunda agar dilüsyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada trimetoprim/sulfametoksazol için MİK aralığını 0.1/1.9-4/76 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini 4/76 µg/ml olarak saptamışlardır (158). Qadri ve ark. 1993 yılında 105 *B.melitensis* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada trimetoprim/sulfametoksazol için MİK aralığını 0.12-1.0 µg/ml olarak (160), yine 1993 yılında 126 *B.melitensis* suşunda agar dilüsyon metoduyla yaptıkları çalışmada ise 0.12-2.0 µg/ml olarak tespit etmişlerdir (161). Lopez-Merino ve ark. 2004 yılında 97 *Brucella* spp. suşunda yaptıkları çalışmada trimetoprim/sulfametoksazol için MİK<sub>90</sub> değerini 8 µg/ml olarak saptamışlar ve test ettikleri antibiyotikler içerisinde en zayıf aktivite gösteren ajan olduğunu vurgulamışlardır (165).

Bodur ve ark. 2003 yılında 41 *B.melitensis* suşunda E test yöntemi ile yaptıkları çalışmada trimetoprim/sulfametoksazol için MİK<sub>90</sub> değerini 0.38 µg/ml olarak elde edilmişlerdir (168). Eşel ve ark. 2004 yılında 74 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları çalışmada trimetoprim/sulfametoksazol MİK değerini ≤0.5-9.5 µg/ml olarak saptamışlardır (175). Baykam ve ark. 2004 yılında 42 *Brucella* suşunda E test metodu ile yaptıkları çalışmada trimetoprim/sulfametoksazol için MİK aralığını 0.047-3.0 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 0.50 µg/ml ve 1.5 µg/ml olarak bildirmişlerdir (169). Orhan ve ark. 2005 yılında 16 *B.melitensis* suşunda yaptıkları çalışmada trimetoprim/sulfametoksazol için MİK aralığını 0.064-0.125 µg/ml olarak bildirmişlerdir (171).

Çalışmamızda 50 *B. melitensis* suşunda trimetoprim/sulfametoksazol için agar dilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemlerinde MİK aralığı 2-8 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 4 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değeri 8 µg/ml, E test yönteminde ise MİK

aralığı 0.064-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 0.25 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değeri 0.25 µg/ml olarak saptanmıştır. Agar dilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemlerinde elde ettiğimiz değerler Rubinstein ve ark. (157), Lopez-Merino ve ark.'nın (165) 77

yaptıkları çalışmaların sonuçları ile uyumlu, E test yönteminde elde ettiğimiz sonuçlar ise Bodur ve ark. (168), Baykam ve ark. (169), Orhan ve ark.'nın (171) yaptıkları çalışmaların sonuçları ile benzer bulunmuştur (Tablo VII). Duyarlılık sınırları içerisinde olmakla birlikte E test yönteminde elde edilen değerler diğer iki test yönteminde elde edilenlere göre daha düşük saptanmıştır. Ancak in vitro olarak *Brucella*'lara karşı duyarlılık sınırları içinde olduklarından, tedavide tercih edilebilecek antibiyotikler arasında yer almaktadır.

Çalışmamızda suşların tamamında elde edilen MİK değerleri CLSI'nın güç üreyen bakterilerden olan *Haemophilus* türleri için belirlediği sınır değerler dikkate alındığında; doksisisiklin, siprofloksasin, streptomisin, her üç test yönteminde de suşların tümüne karşı %100 duyarlı, trimetoprim/sulfametoksazol ise BSAC'nın (183) *H. influenzae* için belirlediği MİK zon aralıklarına göre değerlendirilerek her üç test yönteminde de suşların tamamı %100 duyarlı bulunmuştur.

Rifampisine karşı mikrodilüsyon testinde suşların %74'ü duyarlı, %26'sı orta duyarlı, agar dilüsyon testinde %76'sı duyarlı, %24'ü orta duyarlı, E test yönteminde suşların %86'sı duyarlı, %14'ü orta duyarlı olarak saptanmıştır.

Azitromisine karşı ise mikrodilüsyon testinde suşların %90'sı duyarlı, %10'u dirençli, agar dilüsyon testinde suşların %90'sı duyarlı, %10'u dirençli, E test yönteminde suşların %96'sı duyarlı, %4'ü dirençli saptanmıştır. Bu nedenle azitromisin ile yapılan kombine tedavilerde yanıt oranlarının düşük olabileceği akılda tutulmalıdır.

78

### Tablo VII: Türkiye'de *Brucella* Suşlarında Yapılan Antibiyotik Duyarlılık Çalışmaları

Yıl DOX (µg/ml) RF (µg/ml) STR (µg/ml) CIP (µg/ml) TMP/SMZ (µg/ml) AZT (µg/ml)  
Aralık MİK<sub>50</sub> MİK<sub>90</sub> Aralık MİK<sub>50</sub> MİK<sub>90</sub> Aralık MİK<sub>50</sub> MİK<sub>90</sub> Aralık MİK<sub>50</sub> MİK<sub>90</sub> Aralık MİK<sub>50</sub> MİK<sub>90</sub> Aralık MİK<sub>50</sub> MİK<sub>90</sub>

1992 (Doğanay) 0.125-

0.25

1993

(Sümerkan)<sup>A</sup>

0.5

1993 (Akova)<sup>M</sup> 0.03-0.5 0.5 0.03-1 0.5

1996 (Evrensel)<sup>A</sup> 0.06-1 0.12 0.25 0.5-4 1 2 0.25-1 0.5 0.5 0.5-32 2 8

1999 (Akova)<sup>M</sup> <0.125-8 <0.125 <0.125 1-32 2 2 0,25-8 1 2 <0,125

-8

0.5 2 <0.125-

4

1 1

2003 (Bodur)<sup>E</sup> 0.064 0.75 0.25 0.38

2004 (Baykam)<sup>E</sup> <0.016-

0.094

0.032 0.064 0.19-

1.5

0.75 1 0.064-

0.5

0.094 0.19 0.047-3 0.5 1.5

2004 (Eşel)<sup>A,E</sup> ≤0,125 ≤2 ≤0,5/9,5

**2005 (Kaya O.)**<sub>M</sub> 0.016-

0.512

0.64 0.5-16 2 1-32 2

**2005 (Orhan)**<sub>E</sub> 0.19-

0.125

0.12 0.25 0.75-3 1 2 0.19-

0.125

2 2 0.064-1 0.5 0.5 0.064-

0.125

0.25-8 1 4

**2005 (Kaya F.)**<sub>E</sub> 0.25-2 0.094-

1.5

**2005**

**(Yaşlıoğlu)**<sub>E</sub>

0.125-

1.5

0.75 0.094-

0.5

0.064-

0.5

0.19

**2005**

**(Yamazhan)**<sub>A</sub>

0.25 0,5 0.5 2 32

**2005 (Tanyel)**<sub>M</sub> 0.5 8

**2006 (Afyon)**<sub>M</sub>

<sub>A</sub>

<sub>E</sub>

0.064-

0.5

0.064-

0.5

0.064-

0.5

0.25

0.25

0.25

0.5

0.5

0.5

0.5-2

0.5-2

0.5-2

111

222

0.5-2

0.5-2

0.5-2

111

222

0.125-1

0.125-1

0.125-1

0.25

0.25

0.25

0.5

0.5

0.5

2-8

2-8

0.064-0.5

440

.25

880

.25

0.5-8

0.5-8

0.5-8

442

444

Gür ve ark. 1999 yılında mikrodilüsyon ve E test yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada testler arasındaki uyumu streptomisin için %82, rifampisin için %91, azitromisin için %95, doksisisiklin için %100 olarak saptamışlardır (177).

Eşel ve ark. 2004 yılında 74 *B. melitensis* suşunda agar dilüsyon ve E test yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada testler arasındaki uyumu siprofloksasin için %95, doksisisiklin için %98, rifampisin için %97, streptomisin için %88 olarak saptamışlardır. Trimetoprim/sulfametoksazol için ise uyumu %72 gibi düşük bir oranda saptamışlar ve bu sonuçlara göre E testin bazı antibiyotikler için uygun bir yöntem olmadığını vurgulamışlardır (175).

Çalışmamızda antibiyotik duyarlılık test metodları arasındaki uyuma baktığımızda ise; streptomisin, siprofloksasin, doksisisiklin ve trimetoprim/sulfametoksazol için mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri arasındaki uyum %100, agar dilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %100, mikrodilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %100, her üç test yöntemi arasındaki uyum ise %100 olarak saptanmıştır. Rifampisin için mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri arasındaki uyum %78, agar dilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %82, mikrodilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %84, her üç test yöntemi arasındaki uyum ise %74 olarak saptanmıştır. Azitromisin için mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri arasındaki uyum %100, agar dilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %96, mikrodilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %94, her üç test yöntemi arasındaki uyum ise %94 olarak saptanmıştır. Dolayısıyla E test, uyumun %100 olarak saptandığı bu antibiyotiklerde duyarlılığı araştırmak için pratik olmasından dolayı tercih edilebilecek yöntemlerden birisi olarak görülmektedir.

## VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bruselloz; ülkemiz ve bölgemizde oldukça yaygın olması, tüketilen gıdalar ve mesleki uğraş ile yüksek bulaşma riski taşıması, klinik olarak pek çok hastalığa benzer semptomlar göstermesi nedeni ile sıklıkla klinik tanı konulamaması ve mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin çeşitli nedenlerden dolayı kliniği zaman zaman desteklememesi gibi sorunlar yüzünden oldukça önemli zoonotik bir enfeksiyondur.

Bruselloz tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin farmakokinetiği, fagositler içine penetrasyonu ve etkinliği, hastanın tedaviye uyumu gibi faktörler tedavi başarısını etkilemektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ve önerileri, maddeler halinde aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür.

1- *B. melitensis* suşlarıyla yaptığımız duyarlılık testinde kullandığımız antibiyotiklerin düşük MİK değerleri, dolayısıyla in vitro etkinlikleri iyi olan antibiyotikler oldukları söylenebilir.

2- Her ne kadar klinik bakteriyoloji laboratuvarlarında *Brucella* bakterileri için rutin antimikrobiyal duyarlılık testi önerilmesede (152);

tedavi başarısızlığı, relaps ve reinfeksiyon durumlarında E test ile sinerji testlerinin yapılması tedavi yaklaşımının belirlenmesinde yol gösterici olabilir.

3- *Brusella* cinsi bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleriyle ilgili (test prosedürü yorumlama kriterleri) henüz uluslararası bir standardizasyon olmamakla birlikte (152); bu çalışmada, E test yönteminin daha az yoğunlukta çalışmayı gerektiren, daha pratik bir metod olduğu, bruselloza karşı tedavi yaklaşımının kısa zamanda belirlemede yol gösterici olabileceği kanıtına varılmıştır.

81

4- Mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri uygulamaları zor ve zaman alıcı, ayrıca kontaminasyon riski daha yüksek olan yöntemlerdir. Bu nedenle brusellozda daha çok karşılaştırma ve araştırma çalışmalarında kullanılmasının uygun olacağı kanıtına varılmıştır.

5- Azitromisine karşı dirençli suşların olduğu gözlenmiştir.

Dolayısıyla azitromisinin kullanıldığı tedavi rejimlerinde bu durumun dikkate alınması gerektiği düşüncesindeyiz.

82

## VII. ÖZET

### **BRUCELLA SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Bruselloz, Ortadoğu ve bölgemizde hala endemik olan bir infeksiyon hastalığı olarak geniş kitleleri etkilemektedir. *Brucella* türlerinin intrasellüler yerleşimi nedeniyle tedavide çeşitli sorunlar yaşanmaktadır. Hastalığa bağlı ciddi komplikasyonların ve relapsların önlenmesi için hücre içine iyi penetre olan antibiyotiklerle kombine tedavi gereklidir.

Çalışmamızda temel geçim kaynağının hayvancılık olduğu Afyon bölgesinden ve çevre illerden gelen brusellozlu hastaların kan kültürlerinden izole edilen 50 *B. melitensis* suşunun çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıklarının farklı yöntemlerle belirlenmesi amaçlandı. *Brucella* suşlarına karşı altı farklı antibiyotik için in vitro etkinlikleri agar dilüsyon, mikrodilüsyon ve E test olmak üzere üç yöntem kullanılarak araştırıldı. Daha sonra elde edilen sonuçlar uyum açısından karşılaştırıldı.

Çalışmamızda testler arasındaki uyuma bakıldığında; streptomisin, siprofloksasin, doksisiklin ve trimetoprim/sufometoksazol için mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri arasındaki uyum %100, agar dilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %100, mikrodilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %100, her üç test yöntemi arasındaki uyum ise %100 olarak saptanmıştır.

Rifampisin için mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri arasındaki uyum %78, agar dilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %82, mikrodilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %84, her üç test yöntemi arasındaki uyum ise %74 olarak saptanmıştır. Azitromisin için mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testleri arasındaki uyum %100, agar dilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %96, mikrodilüsyon ve E test yöntemleri arasındaki uyum %94, her üç test yöntemi arasındaki uyum ise %94 olarak saptanmıştır.

83

Bu bulgulara göre; brusellozda test edilen antibiyotikler ve testlerle ilgili uluslararası bir standardizasyon olmamakla birlikte, E test yönteminin daha pratik bir metod olduğu, bruselloza karşı tedavi yaklaşımının kısa zamanda belirlemede yol gösterici olabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar kelimeler:** *Brucella*, agar dilüsyon, mikrodilüsyon, E test

84

## VIII. SUMMARY

### DETECTION OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY AMONG *BRUCELLA* STRAINS BY DIFFERENT METHODS

Brucellosis, which is an endemic infectious disease, still affects a wide population in the middle East and our country. There are several problems in the treatment of the disease because *Brucella* species are intracellular microorganisms. In order to prevent serious complications and relapses, we have to use combined antibiotherapy that can penetrate into the intracellular compartment.

In this study we aimed to detect the antibiotic susceptibilities of 50 *B.mellitensis* strains which were isolated from the blood samples of patients with brucellosis, originated from Afyon and surrounding area, who is dealing stockbreeding, by different methods. In vitro susceptibilities of six different antibiotics *Brucella* strains against were investigated with using three methods; agar dilution, microdilution and E test. Then the results were evaluated in term of correlation between each other

Each accordance was detected as between microdilution and agar dilution tests %100, between agar dilution and E test %100, between microdilution and E test %100, and between three tests %100, for streptomycine, ciprofloxacin, doxycycline and trimethoprim/sulphamethoxazole. The accordance for rifampicine between microdilution and agar dilution tests was %78, between agar dilution and E test was %82, between microdilution and E test was %84 and between the three tests was %74. The accordances for azithromycine were detected as, between microdilution and agar dilution, between agar dilution and E test, between microdilution and E test and between the three tests were %100, %96, %94 and %94 respectively.

85

According to these results we concluded that E test is more practical and can help to lead the treatment against brucellosis in a short time, despite there is no international standardization about the methodology and intervals of antibiotic susceptibility.

**Key words:** *Brucella*, agar dilution, microdilution, E test.

86

## IX. KAYNAKLAR

1. Sümerkan B. Brusella Türleri; Willke A, Söyletir G, Doğanay M (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi cilt 2*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2002; 1647-1652.
2. Badur S: Brusellozda serolojik tanı ve seroepidemioloji. *Klinik Derg.*, 1990; 3:17-20.
3. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları Fakülteler



Kitabevi. İzmir, 2002; 475-478.

4. Young EJ. *Brucella species*. In : Mandel GI, Bennet JE, Dolin R. Principles and practice of infectious Diseases. Churchill Livingstone. Philadelphia, 2000; 2386-2393.

5. Black TF. Brucellosis. In: Cohen J, Powderly WG. Infectious Diseases. 2nd ed. Mosby: Elsevier, 2004;1665-1667,

6. Gotuzzo E, Cellillo C. Brucella. In : Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). Infectious Diseases. 2nd Edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1992; 1513-1521.

7. Baysal B. Brucella. Ustaçelebi Ş(ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. I. Baskı: Öncü Basımevi. Ankara, 1999; 571-577.

8. Young EJ. An overview of human brucellosis. CID 1995; 21:283-289.

9. Dantel S, Jane D. Wong. Brucella In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM pres.1999; 625-631,

10. Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzet PH: Major outer membrane proteins of *Brucella* spp: past, present and future, *Vet Microbiol* 2002; 90:229.

11. Vizcaino N, Cloeckaert A, Verger J, Grayon M, Fernandez-Lago L: DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microb Infect* 2000; 2:1089.

12. Corbel MJ: Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Vet. Bull* 1985; 55(12):927-947.

13. Allen CA, Adams LG, Ficht TA: Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival, *Infect Immun* 1998; 66:1008.

87

14. Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G: Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry, *Infect Immun* 1995; 63:3945.

15. Price RE, Templeton JW, Adams LG: Survival of smooth, rough and transposon mutant strains of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages, *Vet Immunol Immunopathol* 1990; 26:353.

16. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaino N: Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*, *FEMS Microbiol Lett* 1996; 1:145.

17. Vizcaino N, Kittelberger R, Cloeckaert A, Marin CM, Fernandez-Lago L: Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species, *Infect Immun* 2001; 69:7020.

18. Cloeckaert A, Jacques I, Limet JN, Dubray G: Immunogenic properties of *Brucella melitensis* cell-wall fractions in BALB/c mice, *J Med Microbiol* 1995; 42:200.

19. Dubray G, Bezar: Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis, *Ann Rech Vet* 1980; 11:367.

20. Sowa BA, Kelly KA, Frey M, Adams LG: SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex

of *Brucella abortus*, *Vet Microbiol* 1991; 27:351.

21. Cloeckaert A, Zygmunt MS, de Wergifosse P, Dubray G, Limet JN: Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies, *J Gen Microbiol* 1992; 138:1543.

22. Jimenez de Bagues MP, Elzer PH, Blasco JM, Marin CM, Gamazo C, Winter AJ: Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines, *Infect Immun* 1994; 62:632.

23. Bowden RA, Estein SM, Zygmunt MS, Dubray G, Cloeckaert A: Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies, *Microbes Infect* 2000; 2:481.

24. Kittelberger R, Diack DS, Vizcaino N, Zygmunt MS, Cloeckaert A: Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay, *Vet Microbiol* 1998; 59:213.

88

25. Edmonds MD, Cloeckaert A, Booth NJ, Fulton WT, Hagijs SD, Walker JV, Elzer PH: Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25kDa outer membrane protein in cattle, *Am J Vet Res* 2001; 62:1461.

26. Zygmunt MS, Gilbert FB, Dubray G: Purification, characterization and seroactivity of a 20-kilodalton *Brucella* protein antigen. *J Clin Microbiol*, 1992; (30)10:2662-2667.

27. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, Sixth Report. Technical Reports Series 740. WHO, Geneva, 1986.

28. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H: *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria, *J Bacteriol* 1990; 172:3569.

29. Yanagi M, Yamasato K: Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer, *FEMS Microbiol Lett* 1993; 107:115.

30. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M: Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*, *Mol Microbiol* 1998; 27:99.

31. Ficht TA, Hussein HS, Derr J, Bearden SW: Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains, *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:329.

32. Gandara B, Merino AL, Rogel MA, Martinez-Romero E: Limited genetic diversity of *Brucella* spp, *J Clin Microbiol* 2001; 39:235.

33. De Wergifosse P, Lintermans p, Limet JN, Cloeckaert A: Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*, *J Bacteriol* 1995; 177:1911.

34. Altoparlak Ü. Brusellozun etiyolojisi. *Ankem Dergisi* 2003; 17(3):330-332.

35. Türkçapar N, Kurt H. Bruselloz. Uzun Ö, Ünal S ( eds ). Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları Cilt 2, Bilimsel Tıp yayınevi, Ankara, 2002; 1015-1024.

36. Arda M, Minbay A, Aydın N, Leloğlu N, Akay Ö: Özel mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 741, Erzurum, 1992, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, 1992; 197-223.
37. Çelebi S. Bruselloun Epidemiyolojisi. *Aknem Derg*, 2003; 17 (3):340-343. 89
38. Akdeni H, Buzgan T, Karahocagil MK, Demiröz AP: Hayvancılıkla uğraşan bir ailede *B. melitensis*'e bağlaile içi bruselloz, *9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Program ve Özet Kitabı, Antalya 1999; 210-227.
39. FazlıAŞ: Brusellozun epidemiyolojisi, *Bruselloz Simpozyumu* kitabı, Ankara, 2000; 30.
40. Günay O: Brusellosis'in epidemiyolojisi ve korunma yolları, *24. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, Kongre kitabı, Kayseri, 1990; 83.
41. Sağlık Bakanlığı verileri ([www.saglik.gov.tr](http://www.saglik.gov.tr) istatistikler/Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Çalışma Yıllığı).
42. Ayaz C. Brusellozun Türkiye'deki Durumu. *Klinik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı*, 2005; 102-105.
43. Yüce A. Türkiye'de Bruselloz XXXI. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı* 2004; 119-122.
44. Altındış M. Afyon bölgesi besicilerinde, kasaplarda, süt ürünleri toplayıcı ve imalathanelerinde çalışanlarda bruselloz seropozitifliği. *İnfeksiyon Dergisi* 2001; 15(1):11-15.
45. Turgut H, Hoşoğlu S, Aydın K, Arıtürk S. Brucellosis: Clinical and laboratory findings in 98 patients. *Medical Journal of Ege University* 1991; 1(3):153-154.
46. Taşova Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, İnal S. Bruselloz: 238 erişkin olgunun klinik, laboratuvar ve tedavi özelliklerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 1998; 12:307-312.
47. Gür A, Geyik MF, Dikici B, Nas K ve ark. Complications of brucellosis in different age groups: A study of 283 cases in Southeastern Anatolia of Turkey. *Yousei Medical Journal* 2003; 44:33-34.
48. Çetinkaya Z, Aktepe OC, Çiftçi İH and Demirel R. Seroprevalence of Human Brucellosis in a Rural Area of Western Anotolia, Turkey. *J Health Popul Nutr*. 2005; 23(2):137-141.
49. Koşar A, Aygündüz M, YaylıG. İkiyüzeksen bruselloz olgusunda farklı iki tedavinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2001; 15(4):433-437.
50. İyisan AS, Akmaz O, Duzgun SG, Ersoy Y, Eskiizmirliler S, Guler L *et al*. Sero-epidemiology of brucellosis on cattle and sheep in Turkey. *J Pendik Vet Microbiol* 2000; 31:21-75.
- 90
51. TaşçıF. Gıda Kaynaklı Brucellosis ve Önemi. *Uludağ Univ. J. Fac Vet. Med.* 2004; 1-2-3:137-142.
52. Noparstek E, Block CS, Slavin S: Transmission of brucellosis by bone marrow transplantation. *The Lancet*, 1982; 1:574-575.
53. Ertem M, Kurekçi AE, Aysev D, Unal E, İkinçioğullarıA. Brucellosis transmitted by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26(2):225-6.

54. Baldwin C.: Pathogenesis of Brucellosis. Intracellular Bacterial Infections. Ed.: Pechere E.J. First edit. Cambridge Med. Pub 1996; 87-92.
55. Intracellular Bacterial Pathogens. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). Basic and Clinical Immunology. 8<sup>th</sup> edition. Appleton and Lange Co., Connecticut, 1994; 633-635.
56. Göral G. Hücre İçi Bakterilerin Yaptığı Hastalıkların İmmunopatogenezi. 28. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 4-9 Ekim Kongre Kitabı, Antalya, 1998; 111-114.
57. Hall W.H.: Brucellosis. Bacterial infections of humans. (Eds) Evans A.S., Brachman, P.S. Second edition, Plenum Publishing Corporation. New York and London, 1991; 133-151.
58. Jiang X., Baldwin C. L.: Iron Augments Macrophage-Mediated Killing of *Brucella abortus* Alone and in Conjunction with Interferon Gamma. Cell Immunol. 1993; 147:397-407.
59. Ocon P., Regea J.M., Morato P., Jaurez C., Alanso A. And Colmenoro J.D.: Phagocytic Cell Function in Active Brucellosis. Immun. 1994; 62 (3):910-914.
60. Zhan Y., Kelso A. and Cheers C.: Differential Activation of *Brucella* Reactive CD4 T Cells by *Brucella* Infection or Immunization with Antigenic Extracts. Infect. Immun. 1995; 63 (3): 969-975.
61. Chugh TD, Nusrat H, Mustafa AS. A study of secreted cytokine profile in human brucellosis. 11<sup>th</sup> ECCMID 1-4 April Congress Book, Istanbul, Turkey. 2001; 601.
62. Campbell G.A., Adams L.G.: The Long-Term Culture of Bovine Monocyte-Derived Macrophages and Their Use in the Study of Intracellular Proliferation of *Brucella abortus*. Vet. Immunol. Immunopatol, 1992; 34:291-305.
63. Arija J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992; 14:131-140.
- 91
64. Pellicer T., Ariza J., Foz., Fallares R. And Gudiol F.: Specific Antibodies Dedected During Relapse of Human Brucellosis: J. Infect. Dis. 1987; 157 (5): 918-924.
65. Dahouk SA, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of Brucellosis-A review of the literature. Part II. Serological tests for brucellosis. *Clin Lab*. 2003; 49:577-89.
66. Ferr A.I., Parslow T.G. and Stites D.P.: Basic and Clinical Immunology. Eight edition. Lange Medical Publications, New Jersey, 1994; 633-635.
67. Ertek M. Bruselloz: Klinik Formları ve Özellikleri. *Aknem Derg* 2003; 17 (3):333-335.
68. Geyik F. M. Brusellozun Klinik Formları. *Klimik Dergisi*. 30 Mart-3 Nisan İstanbul Kongresi kitabı. 2003; 209-210.
69. Ayaşlıoğlu E, Aydın G, Beygo B. Olekranon Bursiti Saptanan Bir Bruselloz Olgusu. *Klimik Derisi*. 2004; 17(3): 211-213.
70. Solera J, Lozano E, Martinez-Alfaro E, Espinoza A, Castillejos ML, Abad L: Brucelar spondylitis: review of cases and literature survey. *CID* 1999; 29: 1440-1449.

71. AteşÖ, ÇaylıSR, Koçak A, Kutlu R, Önal RE, Tekiner A. Spinal epidural abscess caused by Brucellosis. *Neurol Med Chir* 2005; 45:66-70.
72. Ablin J, Mevorach D, Eliakim R. Brucellosis and the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* 1997; 24 (1):25-29.
73. Bodur H, Çolpan A, Erbay A, AkıncıE, Eren S. Akut Batın Tablosunu Taklit Eden Bruselloz Olgusu. *Klimik Dergisi*. 2003; 16(1): 41-42.
74. Fernandez MD, Garcia JLZ, Garcia FD, Fernandez MTC. Brucella acute abdomen mimicking appendicitis. *Am J Med* 2000; 108(7):599-600.
75. Jorens PG, Michielsen PP, Van den Ender EJ, et al. A rare cause of colitis-Brucella melitensis. *Dis Colon Rectum* 1991; 34:194-96.
76. Özsoy MF, Koçak N, Çavuşlu Ş. Brusella orşiti: 5 olgu sunusu. *Klimik Derg* 1998; 11(3):82-87.
77. Cesur S, Çapar Y, Demir P, Kurt H, Sözen TH, Tekeli E. *Brucella Orşiti: Dört Olgunun İncelenmesi*. *Klimik Dergisi*, 2002; 15(1):22-24.
- 92
78. Türkçapar N, Kurt H. Bruselloz. Uzun Ö, Ünal S (eds). *Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları* Cilt 2. Ankara: Bilimsel Tıp yayınevi, 2002; 1015-1024.
79. Odeh M, Oliven A. Acute brucellosis associated with massive proteinuria. *Nephron* 1996; 72:688-689.
80. 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* 2002; 34:477-480.
81. Fenkci V, Cevrioglu S, Yılmaz M. Ovarian abscess due to Brucella melitensis. *Scand Infect Dis*, 2003; 35:762-763.
82. Madkour M.M. Brucellosis. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Fauci A. S., Braunwald E., İsselbacher K.C., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L. Fourteenth Edition. 1998; 969-971.
83. Heper Y, Yılmaz E, Akalın H, Mıstık R, HelvacıS. Nörobruselloz: 9 Olgunun irdelenmesi. *Klimik dergisi*, 2004; 17(2):99-102.
84. Özışık HI, Ersoy Y, Tevfik MR, Kızıktın S, Özcan C. Isolated intracranial hypertension : a rare presentation of neurobrucellosis. *Microbes and Infect* 2004; 6: 861-863.
85. McLean DR, Russell N, Kahn MY. Neurobrucellosis: Clinical and therapeutic features. *Clin Infect Dis* 1992; 15:582.
86. Keles C, Bozbuga N, Sismanoglu M, et al. Surgical treatment of brucella endocarditis. *Ann Thorac Surg* 2001; 71:1160-1163.
87. Al-Kasab S, Al-Fagih MR, Al-Yousef S, et al. Brucella infective endocarditis: successful combined medical and surgical therapy. *Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95: 862-867.
88. Pappas G, Bosilkovski M, Akritidis N, Mastora M, Krteva L, Tsianos E. Brucellosis and Respiratory System *CID* 2003; 37:95-99.
89. Shalev H., Abramson O. And Levy j.: Hematolojik manifestations of brucellosis in children. *Pediatr.Infect. Dis. J.* 1994; 13 (6):543-545.
90. Tsirka A, Markesinis I, Getsi V, Chalou S: Severe Thrombocytopenic purpura due to brucellosis, *Scand J Infect Dis* 2002; 34:535.

91. Yarmis A, Kervancıoğlu M, Yıldırım I, Soker M, Derman O, Tas MA: Severe microangiopathic hemolytic anemia, and thrombocytopenia in child with *Brucella* infection, *Ann Hematol* 2001; 80:546.
- 93
92. Berger TG, Guill MA, Goette DK: Cutaneous lesions in brucellosis. *Arch Dermatol*, 1981; 117: 40-42.
93. Gungur K, Bekir NA, Namiduru M. Ocular complications associated with brucellosis in an endemic area. *Eur Ophthalmol* 2002; 12:232-237.
94. Aktaş O. Brusellozda Mikrobiyolojik Tanı. *ANKEM derg* 2003; 17(3): 336-339.
95. Marin CM, Alabart JL, Blasco JM: Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*, *J Clin Microbiol* 1996; 34:426.
96. Gotuzzo E, Corillo C, Guerra J. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis. The value of bone marrow culture. *The Infec Dis* 1986; 153:122-125.
97. Kolman S, Mayan MC, Gotesman G, Rozenszajn LA, Wolach B, Lang R. Comparison of the Bactec and lysis concentration methods for recovery of *Brucella species* from clinical specimens.: *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10(8):647-648.
98. Coppola N. New diagnostic frontiers in brucellosis, *Infez Med* , 2001; 9:130-134.
99. Bricker BJ: PCR as a diagnostic tool for brucellosis, *Vet Microbiol* 2002; 90:435.
100. Navarro E, Esribano J, Fernandez J, Solera J: Comparison of three different PCR methods of detection of *Brucella* spp. In human blood samples, *FEMS Immunol and Medical Microbiol* 2002; 34:37-147.
101. Fındık D. Bruselloz Tanısında Sorunlar. *Klinik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı*. 2005; 102-105.
102. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez-Gonzalez JJ, Colmenero JD: Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis, *J Clin Microbiol* 2001; 39:3743.
103. Tuncer S, Aşıkoğlu S, Kocagöz S, Hayran M, Ünal S. Diagnostic Evaluation of *Brucella* PCR in Clinical Samples. *IDSA 34<sup>th</sup> Annual Meeting*. September 18-20 New Orleans, 1996.
- 94
104. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordóñez MA, Cardenas A, Colmenero JD. Development and evaluation of a PCR-enzymelinked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis, *J Clin Microbiol* 2003; 41(1):144-148.
105. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordóñez MA, Pichardo C, Colmenero JD. Posttreatment follow-Up of brucellosis by PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12):4163-4166.
106. Cirak MY, Hizel K. The value of polymerase chain reaction methods targeting two different gene regions for the diagnosis of brucellosis. *Mikrobiyol Bul.* 2002; 36(3-4):271-276.
107. Heizmann W, Botzenhart K, Döller G, et. Al. Brucellosis:

- Serological methods compared. *J. Hyg Camb*, 1985; 95:639-653.
108. Araj GF, Brown GM, Haj MM, Madhvan NV: Assessment of brucellosis card test in screening patients for brucellosis. *Epidemiol Infect* 1988; 100: 389.
109. Alton GG, Jones LM, Pietz DE: *Laboratory Techniques in Brucellosis*. Second edition, WHO monograph series No:55, Geneva, 1975
110. Sırmatel F, Türker M, Bozkurt Aİ: Brusellozisin serolojik tanısında kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bül* 2002; 36:161-164.
111. Araj GF, Lulu AR, Mustafa MY, Khateeb MI: Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings, *J Hyg (Lond)* 1986; 97:457-461.
112. Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K: Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis, *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3245.
113. Report of A WHO/MZCP Works hop. Human and Animal Brucellosis Epidemiological Surveillance in the MZCP countries. Damascus Surian Arab Republic 1998, Atina, 1999.
114. Casao MA, Navarro E, Solera J, Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. *J Infect* 2004; 49:102-8.
115. Orduna A, Almaraz, Prado A, Gutierrez MP, Garcia-Pascual A, Duenas A, Cuervo M, Abad R, Hernandez B, Lorenzo B, Bratos MA, Torres AR. Evaluation of immunocapture-Agglutination test (brucellacapt) for serodiagnosis of Human brucellosis. *J. Clin Mic* 2000; 38(8):400-405.
- 95
116. Smits HL, Basahi MA, Diaz R et al. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *J. Clin. Microbiol* 1999; 37:4179-4182.
117. Altuğlu I, Zeytinoğlu A, Bilgiç A, Kancıoğlu S, Karakartal G, Smiths H, Evaluation of Brucella dipstick assay for the diagnosis of acute brucellosis. *Diag Microbiol Intect Dis* 2002; 44:241-243.
118. Nielsen K, Gall D: Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review, *J Immunoassay Immunochem* 2001; 22:183-186.
119. Gotuzzo E, Carillo C. Brucella. Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds), *Infectious Diseases II*. ed, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1998; 1837-1845.
120. Hoşoğlu S, Kaya H, Çobaner A, Ayaz C, Yılmaz S, Özbek N. Brusellozda kemik sintigrafisinin önemi. *Klinik Dergisi* 1998 ; 3 :92-94.
121. ErdenliğS., Şen A. Koyun atıklarından izole edilen *Brucella* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu ve biyotiplendirilmesi. *Pendik Vet. Mikrobiol Derg* 2000; 31(2):31-42.
122. ErdenliğS. Türkiye’de Brucella kökenleri. 30 Mart-3 Nisan İstanbul Kongresi. *Klinik Dergisi Kongre Kitabı*. 2003; 214-216.
123. Özsan K: Brucellosis’in tarihçe ve etiyolojisi. 24. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Haziran, Kayseri, 1990.
124. Özsüt H. : Bruselloz tedavisi. *Klinik Derg*. 1990; 3(1):26-29.
125. Akova M, Uzun Ö, HE Akalın, et al. Quinolones in treatment of human brucellosis. Comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycyclinerifampin

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1993; 37 (9):1831-1834.
126. Hall H.W.: Modern Chemotherapy for Brusellosis in Humans. Rev. Infect. Dis. 1990; 12:1060.
127. Ariza J, Gudiol F, pallares R, et.al. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin. Ann Intern Med,1992; 117:25-30.
128. Kılıç D., Kurt H., Sözen T.H, Kandilci S.: Kan Kültürlerinden izole edilen *Brucella* Cinsi Bakterilerin Antibiyotiklere Duyarlılıkları ve Klinik Yönden Değerlendirilmesi. İnfeksiyon Derg. 1994; 8(1-2):59-62.
129. Lang R, Dagan R, Potasman I, et al. Failure of ceftriaxone in the treatment of acute brucellosis. Clin Infect Dis 1992; 14:506.
- 96
130. İnce D, Dilmener M: Bruselloz tedavisi: Ülkemizde hangi kombinasyonu tercih etmeliyiz? Flora, 1997; 1:12-15.
131. Rubinstein E, and Baldwin C. Management and pathogenesis of brucellosis, JC Pechere ed, In. Intracellular bacterial infections, Cambridge Medical Publications 1996; 87-98.
132. Günhan C. Brusellozun Tedavisi. 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 3-8 Ekim 1999, Antalya. Kongre Kitabı,1999; 30.
133. Khuri-Bulas NA, Droud AN, Azab SM. Treatment of childhood brucellosis : Results of a prospective trial on 113 children. Pediatr Infect Dis J 1993; 12:377.
134. Lubani MM, Dudin KI, Sherda DC, et al. A multicenter therapeutic study of 1100 children with brucellosis. Pediatr Infect Dis J 1989; 8:75.
135. Taşyaran MA, Kaya A, Aktaş O, Yılmaz Ş. Ceftriaxone in the treatment of acute brucella meningitis. *The New Journal of Medicine* 1995; 12:120-1.
136. Cakaloğlu C, Keser N, Alhan C. Brucella mediated prosthetic valve endocarditis with brachial artery mycotic aneurysm. *J Heart Valve Dis* 1999; 8:586-590.
137. Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs* 1997; 53: 245.
138. Fiqueroa DR, Rojas RL, Marcano ES. Brucellosis in pregnancy: Course and perinatal results. *Ginecol Obstet Mex* 1995; 63:190-195.
139. Aksakoğlu G. Bruselloz. Aksakoğlu G, Ellidokuz H (editörler). *Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş İlkeleri* kitabında. 2. Basım. İzmir: Açılım Yayıncılık, 1996; 142-143.
140. NCCLS MİK Testleri Ek Tablolar M100-S13 (M7), 2003.
141. National Committee for Clinical Laboratory Standarts. Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighth informational supplement. NCCLS document M 100-S8, vol. 18. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standarts; 1998.
142. NCCLS MİK Testleri Ek Tablolar M100-S11 (M7), 2002.
143. Shapiro DS, Wong JD. Brucella. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington D.C.: ASM Pres, 1999; 625-631.



144. Şimşek H, ErdenliğS, Oral B, Tülek N. İnsan kaynaklı *Brucella* İzolatlarının Tip-Biyotip Tayini ve Epidemiyolojik Olarak İrdelenmesi. *Klimik Dergisi*, 2004; 17(2):103-106.
145. Wendel HW. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. *Rev Infect Dis* 1990; 12:1060-1099.
146. Montejo MJ, Alberola I, Glez-Zarate P, Alvarez A, Alonso J, Canovas A, Aguirre C. Open randomized therapeutic trial of six antimicrobial agents in the treatment of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1993; 16:671-676.
147. Solero J, Medrano f, Rodriquez M, Geigo P, Paulino J. Comparative Therapeutic and multicenter trial of rifampicin and doxycycline versus streptomycin and doxycycline in human brucellosis. *Med Clin (Barc)* 1991; 96 (1):649-653.
148. Ariza J, Guidol F, Pallares R, Rufi G, Viladrich F. Comparative trial of rifampin-doxycycline versus tetracycline-streptomycin in the therapy of human brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:548-551.
149. Aygen B, Sümerkan B, KardaşY, Doğanay M, İnan M. Bruselloz: 183 olgunun değerlendirilmesi. *Klimik Derg* 1995; 8:13-16.
150. El S, Ural S, Kaptan F, Müftüoğlu I, Coşkun NA. Bruselloz Tedavisinde Siprofloksasin/Rifampisin Kombinasyonunun Etkinliğinin ve Güvenilirliğinin Doksisisiklin/Rifampisin Kombinasyonununki ile Karşılaştırılması: Prospektif Bir Çalışma. *Klimik Dergisi* 1998; 11(3):89-91.
151. Shamelian SOA. Diagnosis and treatment of brucellosis. *Neth J Med* 2000; 56:198-199.
152. Sümerkan B. *Brucella* 'da Duyarlılık Testi. 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler, Program ve Özet Kitabı. 2004; 113-121.
153. Hindler JA, Swenson JM. Susceptibility Testing of Fastidious Bacteria. IN: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington D. C. 1999; 1544-1554.
154. Wendell H, Hall and Robert E, Manton. In Vitro Susceptibility of *Brucella* to Various Antibiotics. *Applied Microbiology* 1970; 600-604.
155. 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* 1986; 17:459-461.
- 98
156. Khan MY, Dizon M, Kiel FW. Comparative in vitro activities of ofloxacin, difloxacin, ciprofloxacin, and other selected antimicrobial agents against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 1409-1410.
157. 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* 1991; 35:1925-1927.
158. Garcia-Rodriguez JA, Munoz Bellido JL, Fresnadillo MJ, Trujillano I. In vitro activities of new macrolides and rifapentine against *Brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(4):911-913.
159. Garcia-Rodriguez JA, Garcia-Snchez JE, Trujillano-Martin I, Garcia-Sanchez E, Garcia-Garcia MI, Fresnadillo MJ. Activity of BAY y 3118, a

- novel 4-quinolone, against *Brucella melitensis*. *J Chemother.* 1994; 6(2):102-106.
160. Quadri SM, Ueno Y. Susceptibility of *Brucella melitensis* to the new fluoroquinolone PD 131628: comparison with other drugs. *Chemotherapy* 1993; 39(2): 128-131.
161. Quadri SM, Ueno Y, Ayub A. Anti-*Brucella* activity of Ro 23-9424, a dual-action antibacterial. *Chemotherapy* 1993; 39(6): 386-389.
162. 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* 1999; 12:185-186.
163. 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* 1999; 43:194-195.
164. Rolain JM, Maurin M, Raoult D. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *Brucella* spp.: clinical implications. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2000; 46:811-814.
165. Lopez-Merino A, Contreras-Rodriguez A, Migranas-Ortiz R, Orrantia-Gradin R, Hernandez-Oliva GM, Gutierrez-Rubio AT, Cardenosa O. Susceptibility of Mexican brucella isolates to moxifloxacin, ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis. *Scand J Infect Dis.* 2004; 36(9):636-638.
166. Akova M, Gur D, Livermore DM, Kocagoz T, Akalin HE. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1298-1300.
- 99
167. Evrensel N. *Brucella* Klinik İzolatlarının Tiplendirilmesi ve Çeşitli Antimikrobiyal Kombinasyonlara İn vitro Duyarlılıkları. Uzmanlık Tezi. Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 1996.
168. Bodur H, Balaban N, Aksaray S, Yetener V, Akinci E, Colpan A, Erbay A. Biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates. *Scand Infect Dis* 2003; 35:337-338.
169. Baykam N, Esener H, Ergonul O, Eren S, Celikbas AK, Dokuzoguz B. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *Int Antimicrob Agents* 2004; 23:405-407.
170. Kaya O. *Brucella* Şuşlarında MIC Yöntemiyle Duyarlılık Araştırması. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2005.
171. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology,* 2005; 140-143.
172. Kaya Fırat S, Oral B, Erdinç FŞ, Tuncer Ertem G, Tülek N, Demiröz AP. *B. melitensis* suşlarında çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının invitro etkinliğinin E-Test yöntemi ile araştırılması. *Klimik 2005 XII. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi kitabı,* 2005; 236.
173. Ayaşlıoğlu E, Kılıç S, Aydın K, Agalar C, Kılıç D, Kaygusuz S. *Brucella melitensis* biyotip 3 Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları. *Klimik*

- 2005 XII. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi kitabı, 2005;244.
174. Tanyel E, Çoban AY, Tekin Koruk S, Hepsert S, Cirit OS, Şimşek H, Tülek N. *B. melitensis* İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılığı. Klimik 2005 XII. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi kitabı, 2005; 218.
175. Eşel D, Sümerkan B, Ayangil D, Telli M. *Brucella melitensis* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Agar Dilüsyon ve Terst Yöntemlerinin Karşılaştırılması. 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler, Program ve Özet Kitabı. 2004; 174.
176. Yamazhan T, Aydemir S, Tunger A, Serter D, Gokengin D. In vitro Activities of Various Antimicrobials against *Brucella melitensis* Strains in the Region in Turkey. *Med Princ Pract*. 2005; 14(6):413-416.
177. Gür D, Kocagöz S, Akova M, Ünal S. Comparison of E test to microdilution for determining in vitro activities of antibiotics against *Brucella melitensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 2337.
- 100
178. Governado M, Canton E, Santos M. In vitro activity of ciprofloxacin against *Brucella melitensis* (Letter). *Eur J Clin Microbiol* 1984; 3:371.
179. Garcia-Rodriguez JA, Garcia-Snchez JE, Trujillano I, Garcia-Sanchez E, Garcia-Garcia MI, Fresnadillo MJ. Susceptibilities of *Brucella melitensis* Isolates to Clinafloxacin and Four Other Neww Fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 1995; 39(5):1194-1195.
180. Doğanay M, Aygen B. Use of ciprofloxacin in the treatment of brucellosis (Letter). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11:74-75.
181. Sümerkan B, Doğanay M, Bakışkan V, Fazlı ŞA, Aygen B. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Brucella melitensis*. *Doğal Tr J Medical Scienses* 1993; 18:17-22.
182. Kocagöz S, Akova M, Altun B, Gür D, Hasçelik G. In vitro activities of new quinolones against *Brucella melitensis* isolated in a tertiary-care hospital in Turkey. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8(4):240-242.
183. BSAC Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Table 10. MIC and zone breakpoints for *H. Influenzae*. 2002; 27.