

**TC.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Figen KULOĞLU

**2002-2004 YILLARINDA TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP  
FAKÜLTESİ'NDE İZOLE EDİLEN BRUCELLA  
KÖKENLERİNDE DOKSİSİKLIN, RİFAMPİSİN,  
STREPTOMİSİN, SİPROFLOKSASİN DUYARLILIĞI'NIN  
AGAR DİLÜSYON VE E TEST YÖNTEMLERİ İLE  
SAPTANMASI**

**(Doktora Tezi)**

**Arzu AKTAŞ**

**EDİRNE-2009**

**T.C  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Figen KULOĞLU

**2002-2004 YILLARINDA TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP  
FAKÜLTESİ'NDE İZOLE EDİLEN BRUCELLA  
KÖKENLERİNDE DOKSİSİKLIN, RİFAMPİSİN,  
STREPTOMİSİN, SİPROFLOKSASİN DUYARLILIĞI'NIN  
AGAR DİLÜSYON VE E TEST YÖNTEMLERİ İLE  
SAPTANMASI**

**(Doktora Tezi)**

**Arzu AKTAŞ**

**Destekleyen Kurum:**

**Tez No:**

**EDİRNE-2009**

## **TEŐEKKÜR**

Bu tezin gerçekleŐmesinde emeĐi geçen, baŐta tez danıŐmanım sayın Doç. Dr. Figen KULOĐLU ve Anabilim Dalı BaŐkanım sayın Prof. Dr. Murat TUĐRUL olmak üzere, bana doktora yapma imkanı veren sayın Prof. Dr. Metin OTKUN ve Prof. Dr. Filiz AKATA'ya, deĐerli bilgilerini benimle paylaŐan sayın Doç. Dr. MűŐerref OTKUN, Doç. Dr. Özlem TANSEL, Doç. Dr. Nermin ŐAKRU, Doç. Dr. Őaban GÜRUCAN'a, Pendik- İstanbul Veteriner Kontrol ve AraŐtırma Enstitűsű'nde tez çalıŐmamda katkıları bulunan Sevil ERDENLİĐ'e, Halk saĐlıĐı uzmanı Dr. Gamze SARAÇOĐLU'na, Uzman Dr. Őermin MERİÇ YAPAR ve Uzman Dr. Erkan AKTAŐ'a, Mikrobiyoloji laboratuvarında çalıŐan teknisyen Metin ALKAN ve Őafak ÖZMEN'e ve tez çalıŐmamda yardımlarını esirgemeyen bűtűn arkadaŐlarıma teŐekkűr ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>28</b>
<b>BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>71</b>
<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>94</b>
<b>TÜRKÇE ÖZET .....</b>	<b>97</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET.....</b>	<b>98</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>100</b>
<b>RESİM LİSTESİ.....</b>	<b>112</b>
<b>TABLO LİSTESİ.....</b>	<b>114</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>116</b>
<b>EKLER</b>	

## KISALTMALAR

<b>BOS</b>	: Beyin Omurilik Sıvısı
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standarts Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü)
<b>CFU</b>	: Colony Forming Unit
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>ESCMID</b>	: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği)
<b>EUCAST</b>	: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu için ESCMID'in oluşturduğu komite)
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>M</b>	: Mukoid
<b>2-ME Testi</b>	: 2- Merkaptöetanol Tüp Aglütinasyon Testi
<b>MİK</b>	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
<b>MİK<sub>50</sub></b>	: Kökenlerin %50'sinin üremesini önleyen MİK değeri
<b>MİK<sub>90</sub></b>	: Kökenlerin %90'ının üremesini önleyen MİK değeri
<b>MHA</b>	: Mueller Hinton Agar
<b>MHB</b>	: Mueller Hinton Buyyon
<b>NH</b>	: Natif Hapten
<b>OMP</b>	: Dış Membran Proteini (Outer Membrane Protein)
<b>Poly B</b>	: Polisakkarit B

<b>PCR</b>	: Polimerize Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
<b>R</b>	: Rough
<b>R-LPS</b>	: Rough Lipopolisakkarit
<b>RTD</b>	: Rutin Test Dilüsyonu
<b>S</b>	: Smooth
<b>SAT</b>	: Serum Aglütinasyon Testi
<b>SDA</b>	: Serum Dekstroz Agar
<b>S-LPS</b>	: Smooth Lipopolisakkarit
<b>TSA</b>	: Trypticase Soya Agar
<b>TSB</b>	: Trypticase Soya Buyyonu
<b>TÜTF</b>	: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi

## GİRİŞ VE AMAÇ

Bruselloz, dünyanın hemen her yerinde özellikle de Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak görülen, *Brucella* cinsi bakterilerin neden olduğu, hem hayvanlarda hem de insanlarda infeksiyon oluşturan bir zoonozdur (1).

Hastalık infekte hayvanların etleri, süt, idrar gibi vücut sıvıları, infekte süt ile hazırlanan süt ürünleri ve infekte hayvanların gebelik materyali ile insanlara bulaşır (2,3). Ayrıca kaza sonucu laboratuvar kaynaklı bulaş, inhalasyon yoluyla bulaş, nadiren de cinsel temas ile ya da inkübasyon döneminde alınmış kan ile transfüzyon sonucu bulaş söz konusu olabilir (1,4). Başlangıçta genel infeksiyon belirtileri ve septisemiyle seyreden hastalık, daha sonra etkenin sıklıkla karaciğer, hematolojik sistem, kemikler, eklemler, genitoüriner sistem, santral sinir sistemi ve kalbe yerleşmesi sonucu organ tutulumları ve komplikasyonlarla seyreder (1,5). Klinik bulgular, seroloji ve etkenin izolasyonu ile tanı konur (1, 4). Bruselloz tedavisinde Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) en son önerdiği tedavi rejimi en az 6 hafta süreyle doksisisiklin (200 mg/gün) ve rifampisin (600-900mg/gün) kombinasyonudur. Alternatif olarak streptomisin (1g/gün, intramüsküler, 14 gün süreyle) ve doksisisiklin (200mg/gün, 6 hafta süreyle) veya tetrasiklin (2g/gün, 4 eşit dozda, 6 hafta süreyle) kombinasyonu önerilmektedir (3,6).

*Brucella* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte (7-14), henüz standardize edilmiş bir test yöntemi veya sonuçların yorumlanmasına yönelik bir kılavuz yoktur.

Bu çalışmada, bruselloz tedavisinde kullanılan doksisisiklin, rifampisin, streptomisin ve siprofloksasin antibiyotiklerinin *B. melitensis* izolatları için minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmesi ve E Test yönteminin *B.*

*melitensis* suşlarının duyarlılıklarının belirlenmesinde alternatif bir test yöntemi olarak kullanılıp kullanılmayacağına değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### TANIM

Bruselloz, *Brucella* cinsi bakterilerle oluşan temelde koyun, keçi, sığır, manda ve domuz gibi hayvanlarda genital organ, meme bezleri ve plasenta infeksiyonlarına yolaçan ve aynı zamanda bunların etleri, süt, idrar gibi vücut sıvıları, infekte sütle hazırlanan süt ürünleri, infekte hayvanın gebelik mataryeli aracılığıyla insanlara bulaşabilen bir meslek hastalığı olup; özellikle büyük baş hayvanlarda yavru atımına, süt ve et verim kaybına, insanlarda ise titreme ile yükselen ateş, kas ve eklem ağrıları ile seyreden klinik tabloya neden olan bir zoonozdur (15-17).

### TARİHÇE

Hastalık ilk olarak Hippocrates tarafından 'humma' olarak tanımlanmış, günümüze değin 'Ondülan ateşi', 'Akdeniz ateşi', 'Malta humması' ve 'Bang's hastalığı' gibi değişik isimlerle anılmıştır (15,16). İnsan brusellozunun ilk doğru tanımlanması, Kırım savaşı sırasında İngiliz ordusunda görev yapan cerrah hekim J.A. Marston tarafından yapıldı (3,18). Hastalık etkenini; 1886'da Malta adasında, Malta hummasından ölen askerlerin dalak pulpasından ilk izolasyonunu başaran ve *Micrococcus* (daha sonra *Brucella*) *melitensis* olarak adlandıran Sir David Bruce'tur (3,6,18). Danimarka'lı hekim Bernard Bang 1895 yılında sığırların uterus duvarı salgısından bulaşıcı düşük etkeni olarak *Bacillus* (daha sonra *Brucella*) *abortus*'u izole etti (3,6,16,18). Wright 1897 yılında, hastalığın tanısında günümüzde de kullanılmakta olan, Serum Aglütinasyon Testini (SAT) ilk kez kullanan kişi olmuştur (18). Akdeniz ateşi hastalığı ile ilgili çalışmalarda 1905 yılında görevlendirilen Maltalı hekim Zammit, *B. melitensis*'in rezervuarının keçiler olduğunu ortaya koymuş ve o dönemde askeri personelin, pastörize

edilmemiş keçi sütünü tüketmesi engellenerek hastalık insidansında dramatik azalma sağlanmıştır (2). Amerikalı bakteriyolog Alice Evans, 1918 yılında Malta ateşi ve Bang hastalığının ajanları arasındaki yüksek orandaki benzerliği gösterdi ve genus, Bruce'a atfen tekrar adlandırıldı (3). Genusun üçüncü üyesi *B. suis*, 1914'de Traum tarafından ABD'nin İndiana eyaletinde prematüre doğan domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden (3,16,18), dördüncü üyesi *B. canis*, 1966'da Carmichael tarafından "kennel-bred" cinsi köpeklerin düşük mataryelinden izole edildi. Diğer türler; *B. ovis* 1953'de koyunlardan, *B. neonatame* 1957'de Utah'daki "desert wood rat"lardan izole edilmiştir (2,3,18). Bu iki türün günümüze kadar insan infeksiyonlarına neden oldukları gösterilememiştir (19). Bunları Rusya ve Alaska'da Ren geyiğinden *B. rangiferi tarandi*'nin izole edilmesi takip etmiştir (16). İngiliz ve Amerikalı bilim adamları 1994 yılında birbirlerinden habersiz olarak, İskoçya kıyısındaki ölen deniz memelilerinden ve Kaliforniya'daki yunuslardan daha önceden bilinmeyen bir *Brucella* kökenini izole ettiler. Ayırt edici metabolik profilleri, boya ve faj duyarlılıkları ile nispeten homojen bir grup oluşturan bu izolatlar *Brucella maris* olarak adlandırıldı (3).

Ülkemizde Birinci Dünya Savaşı sırasında Abdülkadir Noyan ilk bruselloz vakasını askerlerde tanımlamıştır (2,15). Diğer kaynaklara göre ise; Türkiye'de insanlarda ilk bruselloz olgusu 1915 yılında Hüsamettin Kural ve Mahmut S. Akalın tarafından Kuleli Askeri Hastanesi'nde bir erde saptanmıştır. Zühtü Berke tarafından 1931'de sığırlarda, 1943'de Golem ve 1944'de Köylüoğlu ve Aktan tarafından koyun ve keçilerde de saptanmıştır (16,20). Ülkemizde hastalık, ilk kez Malta Adası'nda saptandığından "Malta Humması" veya "Akdeniz Ateşi", tipik ateş trasesi nedeni ile "Dalgalı Humma (Undulant Fever=Ondülan Ateş)", koyunlardan insanlara bulaşması nedeni ile de halk arasında "Koyun Hastalığı" veya "Mal Hastalığı" gibi isimlerle de anılır (2,15).

## **MORFOLOJİ ve BOYANMA ÖZELLİKLERİ**

*Brucella* türleri; 0.5-0,7mm eninde, 0,6-1.5mm boyunda, gram negatif boyanan, fakültatif anaerob, hareketsiz, sporsuz, kirpiksiz, kapsülsüz, aerop, tek tek ve bazen de uç uca zincirler oluşturabilen kokobasillerdir (2,6,16,17,19). Plazmitleri yoktur. Etkenler pilusa sahip olmadıklarından konjugasyon da bildirilmemiştir. Faj infeksiyonunu takiben bazı antibiyotiklere direnç geliştirdiklerinden transdüksiyon yaptıkları kabul edilmektedir. Doğal koşullar altında, nadir de görülse, etkenlerin transformasyona uğradıkları bildirilmiştir (20). Sıvı besiyerlerinden hazırlanan preparatlarda 4-6'lı zincirler yapabilirler (15). İntrasellüler ürerler ve bu nedenle

makrofaj hücrelerinde oluşan fagositoza uğramadan organizmanın koruyucu etkinliklerinden kaçınabilirler (21).

*Brucella*'lar küçük olduklarından moleküler hareket nedeni ile yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). Organizmadan yeni ayrıldıkları zaman smooth (S) tipi ve mukoid (M) kolonilerde ince bir kapsüllerinin bulunduğu saptanır. Pasajlarla ve rough (R) koloni şekillerinde bu kapsüller kaybolur (16,17). Gram boyamada, gram negatif boyanırlar. Gram boyama prosedüründe zıt boya ile preparat 30 saniye boyanır. Ancak *Brucella* bakterileri zıt boya ile zayıf olarak boyandıkları için boya 1-3 dakika uygulanır (19). Çomakçık şeklinde olanlar bazen düzensiz boyanma özelliği gösterirler (17). Gerçek asit-fast olmadıkları halde zayıf asitlerle dekolarizasyona dirençli olduklarından modifiye Ziehl- Neelsen boyama tekniği ile kırmızı renkte boyanırlar. Bipolar boyama ile genelde görülemezler (22).

## ÜREME ve BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

*Brucella* cinsi bakteriler organizmadan yeni ayrıldıklarında genel kullanım besiyerlerinde üremeleri güçlük gösterdiğinden yavaş ürerler (23). Özellikle serum, gliserin ve glikozlu besiyerlerinde üremeyi yeğ tutarlar (23,24). Bilhassa ilk izolasyonda kompleks besiyerleri kullanılması gerekir. Et özeti, triptoz gibi kompleks peptonlu, glikoz ve tuz içeren besiyerlerinde iyi ürerler (24). *Brucella* cinsi bakteriler kemo-organotrofturlar ve çoğu suşlar birçok aminoasit içeren kompleks besiyerlerine ihtiyaç gösterirler. Tiyamin, niyasin, nikotinic asit, vitaminler ve biyotin, magnezyum iyonları üremeleri için esastır (19,24-26). Kan ve serum üremeleri üzerine olumlu etki yapar. Oksidatif metabolizma *Brucella* türleri için temel enerji üretim kaynağıdır (25). Kalsiyum pentenat ve mezoeritritol üremelerini artırır (19,24). Ancak üremeleri için hemin (X faktör) ve NAD (V faktör) gerekli değildir (25,26). Çikolata agar, *Brucella* agar, serum dekstroza agar gibi kan veya serumla zenginleştirilmiş besiyerleri (23), trypticase soy (%5 ilaveli ve ilavesiz koyun kanlı), beyin-kalp infüzyon agar yaygın olarak üretildikleri besiyerleridir (24,26). İlk izolasyondan sonra buyyon ve jeloz gibi basit besiyerlerinde de üremeye alışır (17). *B. abortus* ve *B. suis*'in birçok biyotipi üreyebilmek için özellikle primer izolasyonlarında CO<sub>2</sub>'e gereksinim duyarlar (6). Özellikle *B. abortus* ilk izolasyonda %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortama gereksinim duyar ve yavaş ürer (24). Birkaç pasajdan sonra CO<sub>2</sub>'siz normal aerop koşullarda üremeye alışır. *B. melitensis* ve *B. suis* CO<sub>2</sub>'li ortama gerek göstermezler (17). Zorunlu anaerop şartlarda üremezler (24). Optimal üreme ısısı 37°C olmakla birlikte 20-40°C'de üreyebilirler. Optimal pH'ları 6,6-7,4'tür (25,26). İnkübasyondan 48 saat sonra şeffaf,

yüzeyden kabarık, konveks, parlak yüzeyli S koloniler oluştururlar (25). Diğer türlerin aksine *B. canis* ve *B. ovis* ise R koloni oluştururlar. İnkübasyondan 2-3 gün sonra koloniler görülebilir, ancak 4-5 gün sonra 2-3 mm büyüklüğüne ulaşabilirler (19,24). Koloniler hemolizsiz ve pigmentsizdir (19). *B. melitensis* ve *B. abortus*'un bazı türlerinin kolonileri eski kültürlerde esmer-kahverengi renkte görülebilir (24). *Brucella* bakterilerinin tüm türleri katalaz pozitif ve büyük çoğunluğu oksidaz pozitifdir (*B. ovis* ve *B. neonatame* haricindeki) (17,25). Üreaz oluşturmaları değişkendir (19). Karbonhidratlardan asit ya da gaz yapmamakla birlikte glukozu az miktarda kullanırlar (17). Nitratları nitritlere çevirirler (17,19). Sütte hafif alkali reaksiyon yaparlar. Jelatini eritmezler ve indol oluşturmazlar (17). Metil red ve Vages-Proscauer testleri negatiftir (19,25). Sitrata kullanmazlar. *O*-nitrophenol- $\beta$ -D-galactosidaz'dan *o*-nitrophenol oluşturmazlar (19). H<sub>2</sub>S oluşturma miktarı ve süresi arasında farklar vardır. *B. suis* en uzun süre (19,20) gün ve en fazla miktarda, *B. abortus* orta süre (2 gün) ve miktarda, *B. melitensis* ise en az süre (1 gün) ve miktarda H<sub>2</sub>S4 yaparlar (17,24). *Brucella* bakterilerinin ortak biyoşimik özellikleri Tablo 1'de gösterilmektedir (24).

**Tablo 1: *Brucella* cinsi bakterilerinin ortak biyoşimik özellikleri**

	Katalaz	Oksidaz	Üreaz	Nitratları İndirgeme	Sitrat	Metil kırmızısı	V.Poskauer	Jelatinaz	ONPG
<b>Brucella</b>	+	+	Değ.	+	-	-	-	-	-

**Not:** Tabloda *B. melitensis* biyotip 1, *B. abortus* biyotip 1 ve *B. suis* biyotip 1'in özellikleri görülüyor.  
\**B. ovis* ve *B. neonatame* hariç.

*Brucella* cinsi bakterilerin bazı boyalar ile olan ilişkilerinde de ayrılıklar görülür. Besiyerlerine belli konsantrasyonlarda konulan tiyoinin, bazik fuksin, kristal viyole ve pironin gibi boyalar karşısında *B. melitensis* inhibisyona uğramadan ürer. *B. abortus* yalnız tiyoinin tarafından inhibe olur. *B. suis* ise tiyoinin dışındaki bazik fuksin, metil viyole ve pironin tarafından inhibe edildiği halde, tiyoininden etkilenmeyerek üremesini sürdürür (17). *Brucella* cinsi bakterilerin boyalarda üreme özellikleri Tablo 2'de gösterilmektedir (17).

**Tablo 2: *Brucella* türlerinin boyalarda üreme özellikleri, CO<sub>2</sub>'e ihtiyaçları ve H<sub>2</sub>S oluşumu.**

Tür	H <sub>2</sub> S oluşumu	%10 CO <sub>2</sub>	Thionin 1/50 000	Bazik fuksin 1/25 000	Kristal viyole 1/50 000	Pironin 1/100 000
<i>B. melitensis</i>	1 gün	Gerekmez	Ürer	Ürer	Ürer	Ürer
<i>B. abortus</i>	2 gün	Gerekir	Üremez	Ürer	Ürer	Ürer
<i>B. suis</i>	3-5 gün	Gerekmez	Ürer	Üremez	Üremez	Üremez

*Brucella*'ları özgün olarak eriten bakteriyofajlarla da hem cins hem de tür düzeyinde identifikasyon yapılmaktadır. Bugüne kadar çalışılan tüm *Brucella* fajları DNA fajları olup *Pedoviridae* ailesine dahildirler ve konakçı affinitesine göre altı gruba ayrılmışlardır. Grup 1: Tbilisi (Tb), Grup 2: Firenze (Fi), Grup 3: Weybridge (Wb), Grup 4: Berkley (BK<sub>0</sub>, BK<sub>1</sub>, BK<sub>2</sub>), Grup 5: R/O, Grup 6: R/C. Grup 1 fajlarının prototipi olan Tbilisi fajı rutin test dilüsyonu (RTD)'nda sadece smooth *B. abortus* kültürlerini lize ederken, 10.000xRTD'nda *B. suis* ve *B. neotomae* 'yı "lysis from without" denilen bir fenomenle lize etmektedir. Bu fenomende yüksek sayıdaki fajlardan salınan enzimlerle bakteri hücresi lize edilir ancak fajın hücrede replikasyonu dolayısı ile infektivitesi sözkonusu değildir. Grup 2 fajlarının temsilcisi Firenze fajıdır ve *B. abortus*, *B. neotomae* ve *B. suis* biyotip 4'e karşı aktiftir. Grup 3 fajları Weybridge fajı ile temsil edilir. Bu faj *B. abortus*, *B. neotomae* ve *B. suis*'i lize eder, ancak *B. melitensis*'in çoğu suşlarını lize etmez. Grup 4 fajlarının prototipi olan Berkeley fajı ilk olarak 1976 yılında Douglas ve Elberg tarafından izole edilmiştir. Bu faj tüm S *Brucella* suşlarını lize etmektedir. Grup 5 fajları rough suşları ve rough *Brucella* türlerini lize ederler. R ve bunun derivatı olan R/O fajları stabil değildirler. Ancak *B. canis* Mex 51 üzerinde pasajla elde edilen faj R/C son derece stabildir ve rough tür ve suşlar için referans bir faj olarak kabul edilmektedir. Grup 6 fajı sadece Hindistan'dan izole edilen İzatnagar fajını içerir. Bu faj *Brucella* spp.'in tüm S suşlarını ve aynı zamanda *B. melitensis* ve *B. suis*'in R suşlarını lize etmektedir (20). Test için genellikle, RTD yöntemi uygulanmaktadır (26). Bu grupların *Brucella*'lar üzerindeki litik etkileri Tablo 3'de, tür düzeyinde tanısına ilişkin özellikleri Tablo 4'de ayrıca gösterilmektedir.

**Tablo 3: *Brucella* genus üyelerinin fajlara karşı duyarlılıklarındaki farklar.**

RTD de Fajların Lizisi	<i>B. Abortus</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. Melitensis</i>	<i>B. neotomae</i>	<i>B. Ovis</i>	<i>B. suis</i>			
						biyotip 1	biyotip 2	biyotip 3	biyotip 4
Tb	L	NL	NL	PL	NL	NL	NL	NL	NL
Wb	L	NL	NL	L	NL	L	L	L	L
Fi	L	NL	NL	L	NL	PL	PL	PL	L
Bk <sub>2</sub>	L	NL	L	L	NL	L	L	L	L
R/O	PL	NL	NL	NL	L	NL	NL	NL	NL
R/C	NL	L	NL	NL	L	NL	NL	NL	NL
Konak	Siğir	Köpek	Koyun Keçi	Desert wood rat	Koyun	Domuz	Domuz Tavşan	Domuz	Ren geyiği

Semboller: NL;lizis yapmaz, L;lizis, PL;kısmi lizis yapar . RTD; rutin test dilüsyon.

**Tablo 4: *Brucella* türlerinin ayırıcı özellikleri**

Tür	Koloni morf.	Serum ihtiyacı	Fajlarla lizis			Oksidaz	Üreaz
			Tb	R/C			
			RTD	10 <sup>4</sup> xRTD	RTD		
<i>B. melitensis</i>	smooth	-	-	-	-	+	+
<i>B. abortus</i>	smooth	- <sup>a</sup>	+	+	-	+	+
<i>B. suis</i>	smooth	-	-	+	-	+	+
<i>B. neotomae</i>	smooth	-	-	+	-	-	+
<i>B. ovis</i>	rough	+	-	-	+	-	-
<i>B. canis</i>	rough	-	-	-	+	+	+

*Brucella* cinsi bakterileri (monospesifik antiserumlarla) aglütinasyon deneyi ile de birbirlerinden ayrılırlar (24 ). A ve M antijenleri türlere ve biyotiplere göre farklı orandadırlar. *B. abortus*'un biyotip 1, 2, 3 ve 6; *B. suis*'in biyotip 1, 2 ve 3; *B. melitensis*'in biyotip 2 ve *B. neotomae*'nın A antijeni dominant iken *B. abortus*'un biyotip 4, 5 ve 9; *B. suis*'in biyotip 5 ve *B. melitensis*'in biyotip 1'inde M antijeni dominanttır. *B. melitensis* biyotip 3 ve *B. suis* biyotip 4, A ve M antijenlerini eşit miktarlarda taşırlar. Doğal olarak R koloni morfolojisine sahip ve

rough lipopolisakkaritleri (R-LPS) taşıyan *B. canis* ve *B. ovis*, R antijenini taşımaktadırlar (20). Ayrıca *Salmonella*'ların Vi antijenlerine benzer L antijenleri de gösterilmiştir (24). L-alanin, asparagin, glutamik asit, arginin, sitrulin, lizin, ornitin gibi aminoasitlere, arabinoz, galaktoz, riboz, ksiloz, glukoz, eritritol gibi karbonhidratlara etkileri *Brucella* cinsi bakterilerde farklılık gösterir (15). *Brucella* cinsi üyelerinin tür ve biyotiplerin ayırıcı özellikleri Tablo 5'de gösterilmektedir.

**Tablo 5: *Brucella* genus üyelerinin tür ve biyotiplerin ayırıcı özellikleri (24)**

Biyotip	CO2 gereksinimi	H2S oluşurması	Üreaz aktivitesi	Boya varlığında Üreme			Aglütinasyon			
				<u>Bazik fuksin</u>		Tiyonin	A	M	R	
				20 g/ml	20 g/ml					40 g/ml
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	Değişken	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	Değişken	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	Değişken	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	(+)	+	1-2 saat	+	-	-	+	-	-
	2	(+)	+	1-2 saat	-	-	-	+	-	-
	3	(+)	+	1-2 saat	+	+	+	+	-	-
	4	(+)	+	1-2 saat	(+)	-	-	-	+	-
	5	-	-	1-2 saat	+	+	-	-	+	-
	6	-	(+)	1-2 saat	+	+	-	+	-	-
	9	-	+	1-2 saat	+	+	-	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	0-30 dak.	(-)	+	+	+	-	-
	2	-	-	0-30 dak.	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	0-30 dak.	+	+	+	+	-	-
	4	-	-	0-30 dak.	(-)	+	+	+	+	-
	5	-	-	0-30 dak.	-	+	+	-	+	-
<i>B. canis</i>	-	-	0-30 dak.	-	+	+	-	-	+	
<i>B. neonatame</i>	-	+	0-30 dak.	-	-	-	+	-	-	
<i>B. ovis</i>	+	-	-	(-)	+	+	-	-	+	

*Brucella* cinsinin flogenetik olarak *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobacterum* ve *Rhizobium* ile yakın ilişkili olduğunu gösteren moleküler genetik çalışmalar mevcuttur (27-29). Purple bakteriler  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  olmak üzere dört subdivizyona ayrılır. 16S rRNA baz alındığında *Brucella* türleri  $\alpha$  subdivizyonunda yer alarak (21), *Proteobacteria* sınıfının  $\alpha_2$ -subdivizyonunda sınıflandırılırlar (30). *Brucella* cinsi içinde *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* olmak üzere kültürel, metabolik ve antijenik karakteristiklerine göre, genomik olarak birbirine çok yakın altı tür tespit edilmiştir (28,31). *B. melitensis*' in üç, *B. abortus*' un yedi, *B. suis*' inde beş biyotipi bulunmaktadır (28). *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomae* türlerinde ise herhangi bir biyotip bildirilmemiştir (32). *Brucella* türleri ve biyotipleri halen, konaklarına, kültürel, metabolik ve antijenik özelliklerine, patojenik karakteristikleri ve fajlara duyarlılıklarına göre ayırtediliyor (28). *Brucella* türlerinin genetik olarak birbirlerine son derece yakın olup %90'nın üzerinde (28,33), diğer bir kaynağa göre %95'in üzerinde homoloji gösterdiği kanıtlanmıştır (3). Bu yüzden *B. melitensis*' in *Brucella* cinsi içinde tek tür olarak kabul edilmesi ve diğer türlerin ise bu türün biyotipleri olarak sınıflandırılması önerilmektedir (28,33). Ancak bu monospesifik genusun alttürlerinin evrim ile spesifik konaklara adapte olduğunu göstermektedir. Buna rağmen Xbal gibi düşük ayırım frekanslı restriksiyon endonükleazları kullanılarak yapılan çalışmalar, yapısal ve replikatif fonksiyonları kodlayan pek çok gende polimorfizm olduğunu göstermiştir, bunlarda isimlendirilmiş türlerin ayrımını desteklemektedir (3). *Brucella* tür ve farklı biyotiplerinin ayrımı serotiplendirme, faj tiplendirme, CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S üretimi, üreaz pozitifliği, boya duyarlılığı, monospesifik antiserumlarla olan reaksiyonları gibi farklı testlerle yapılır (24,34). Günümüzde polimerize zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction(PCR)]-bazlı deneyler de *Brucella* cinsi bakterilerinin tür ve farklı biyotiplerinin ayrımında kullanılıyor. Ancak PCR hala laboratuvarların rutin çalışmalarında yer almamaktadır (33).

## **FİZİKSEL VE KİMYASAL ETMENLERE DUYARLILIĞI**

*Brucella* cinsi mikroorganizmalar ısı ve iyonizan radyasyona çok duyarlıdır (6,27). Pastörizasyonda çabuk ölmelerinin epidemiyolojik açıdan önemi vardır. Dezenfaktanlara karşı dayanıksızdırlar (6,17,24) ve 60°C'da 10 dakikada, %0,1 fenolde 15 dakikada tahrip olur. Normal mide asidi mikroorganizmayı öldürmeye yeterlidir. Bunun yanında hayvanların barındığı ahır tozlarında 6 hafta, suda 10 hafta (2), toprakta 10 hafta, gübrede 2 yıl, 4-8°C'de saklanan keçi peynirinde ise 6 aya kadar canlılıklarını sürdürebilirler (6). Düşük yapmış hayvan



fetüsünde 75 gün, infekte çiğ süttten yapılmış dondurmada 30 gün, çiğ süttten yapılmış tuzsuz krema yağında buzdolabında 142 gün, %10 tuz içeren salamura peynirde 45 gün, %17 tuz içerende ise 1 ay yaşayabilir. Bu yüzden salamura peynirlerin yapılış tarihleri tenekelerin üzerinde yazılı olmalı ve buna dikkat edilmelidir (2). Tuzlanmış domuz etinde 3 hafta, insan idrarında en az 7 gün, hayvan dışkısında açıkta 100 gün canlı kaldığı bildirilmiştir (3). Penisiline dirençli, sülfonamid, streptomisin ve tetrasiklinlere duyarlıdır (3,17).

## GENETİK ÖZELLİKLERİ

*Brucella* türlerinin büyük çoğunluğu iki sirküler kromozoma sahiptir. *B. suis*'in dört biyotipinin genomlarının karşılaştırılması göstermiştir ki; biyotip 1'in 2.1 ve 1.15 Mb hacimli ve plazmitsiz iki sirküler kromozoma sahipken biyotip 3 hacmi 3.1 Mb olan bir sirküler kromozoma sahiptir. Biyotip 1'in durumu diğer *Brucella* tiplerine benzemektedir. Biyotip 2 ve 4'ün genomları da iki sirküler genom içerir, ancak bunlar 1.85 ve 1.35 Mb hacindedir (3,33). Bu farklı yapılar üç *rrn* lokusu arasındaki olası iki rekombinasyonun ürünlerine bağlı olabilir (33). *Brucella* genusunda plazmite rastlanmaz ancak konjugatif transferden sonra konağın plazmitlerinden etkilenirler (29,33). DNA'larının G+C içeriği %55-58 mol'dür (26,29). DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarında %95'in üzerinde homoloji olduğu gösterilmiştir (3,28,29,33). Altı türü olduğu düşünülen *Brucella* genusunun DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile monospesifik bir genus olduğu ilk kez 1968 yılında Hoyer ve McCullough tarafından ileri sürüldü (35,36). Verger ve ark. yaptıkları DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarında *B. melitensis*'in tek tür olarak kabul edilmesi ve diğer türlerin ise bu türün biyotipleri olarak sınıflandırılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir (35), yine bilim insanları; tek kromozomlu *B. suis* biyotip 3'ün evrim geçirmesi ile iki kromozomlu *Brucella* tür ve biyotiplerinin oluştuğunu ileri sürmektedirler (21). Ficht ve ark.(19), *B. neotomae* ve *B. ovis*'in outer membrane protein 2 (OMP2) geninin nükleotid sekanslarına göre diğer *Brucella* türlerinden en farklı iki tür olduklarını ve OMP2 lokusunun DNA analizinin tür identifikasyonunda kullanılabilecek nükleotid farklılıklarını ortaya koyduklarını bildirmişlerdir (37).

## ANTİJENİK ÖZELLİKLERİ

Birçok gram negatif bakterilerin aksine *Brucella* spp.'in hücre duvarında pilus, fimbria ve kapsül gibi kompleks yapılar bulunmaz (29). Dış membran, virulans faktörler olarak

tanımlanan lipopolisakkarit (LPS) ve dış membran proteinleri (OMP)'ni içermektedir (29,38,39). Değişik suşlar ile yapılan çalışmalar, birçok *Brucella* antijeninin tüm suşlarda ortak olarak bulunduğunu, sadece somatik LPS antijenlerinin S ve R suşlar arasında önemli farklılıklar gösterdiğini, OMP'nin ise, farklı türlerde değişik yapılarda olduğunu ortaya koymuştur (34,39,40). OMP'nin hücre sel bağışıklıkta LPS antijenlerin ise humoral bağışıklıkta rol aldıkları belirtilmektedir (39).

Smooth Lipopolisakkarit (S-LPS) yapısı, *Enterobacteriaceae* ailesindeki mikroorganizmaların LPS yapısına benzer bir şekilde O-polisakkarit, kor bölgesi ve lipid A'dan oluşmuştur. S suşları, LPS tabakasında A ve M olarak adlandırılan epitoplara taşımaktadır. LPS'in sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezis (SDS-PAGE) analizi, A ve M epitoplarına karşı monoklonal antikor kullanımı ve ayrıca sentetik *Brucella* oligosakkaritleri kullanılarak yapılan inhibisyon çalışmalarının sonucunda, A ve M antijenlerinin linear O zinciri üzerinde bulunan 1,2 ve 1,3 bağlantılarının oranlarına göre birbirlerinden ayrıldığı ortaya konmuştur (29). R-LPS suşların duvar yapısı temelde S-LPS suşların duvar yapısına benzemektedir. Ancak R-LPS suşlar'da O- polisakkarit ya yoktur ya da indirgenmiştir. Bu yüzden daha geniş kor polisakkariti bulunur. Nükleik asit ve protein içermez. Kinoyozamin dışındaki yağ asitleri S-LPS'lerinkinin aynısıdır (29,38).

A serotiplerinde O-polisakkarit,  $\alpha$ -1,2 bağlı 4,6-dideoksi-4-formamido-D-mannopiranosil (N-formil perosamin)'in linear bir homopolimeridir ve *Yersinia enterocolitica* 0:9'un LPS'sine tam olarak uyur. M serotiplerinde ise O-polisakkarit, biri  $\alpha$ -1,2 bağlı ve dördü ise  $\alpha$ -1,3 bağlı olmak üzere toplam beş N-formil perosamin'in tekrarlayan ünitelerinden ibarettir (29,38). A ve M antijenlerine karşı hazırlanan monoklonal antikorlarla yapılan immunoblotting çalışmalarında ya A ya da M determinantına karşı reaksiyon alınmakta her ikisine aynı anda reaksiyon alınmamaktadır. Bu bulgular, her iki antijeni taşıyan *B. melitensis* biyotip 3 ve *B. suis* biyotip 4'de A ve M tipindeki LPS'lerin ayrı molekül olarak sentez edildiklerini göstermektedir (41). A ve M antijenleri *Brucella* bakterilerinde ayrı oranlarda bulunur. A antijeni *B. abortus*'da ve *B. suis*'te (A/B=20/1), M antijeni ise *B. melitensis*'de (A/M=1/20) baskın olan somatik antijenlerdir. Bu suretle aglütinin absorpsiyon testleri ve jel difüzyon tekniği uygulanarak *B. melitensis*'i *B. abortus* ve *B. suis*'ten serolojik olarak ayırmak olanaklı olduğu halde *B. abortus* ile *B. suis*'i birbirinden ayırmak olanaksızdır (3,6,17). S-LPS'e sahip olan suşlar daha fazla virulandır ve polimorf nüveli lökositler

tarafından intrasellüler öldürülmeye daha dirençliyken (42), R-LPS'e sahip olan suşların virülanslıkları ise zayıftır (43). Ancak R-LPS'e sahip *B. suis* ve *B. canis* ise diğer fenotiplerinden daha virulandır (34). *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* suşları major yüzey antijeni olarak ya S-LPS içeren S veya R-LPS içeren R suşlar meydana getirir. *B. ovis* ve *B. canis* major yüzey antijeni olarak R-LPS içeren iki R suşudur. "Desert wood rat"lardan izole edilen *B. neotomae* sadece S suşlar oluşturur (45).

*Brucella* spp. ile *Vibrio cholerae* O:1, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Y. enterocolitica* O:9, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis* gibi bakteriler arasındaki çapraz reaksiyonların sebebi bu bakterilerin LPS tabakalarındaki N-formil perosamin'lerin birbirlerine olan benzerlikleridir (1,16,20,22).

*Brucella* cinsi mikroorganizmaların diğer iki önemli polisakkarit antijenleri natif haptan (NH) ve polisakkarit B (poly B)'dir. NH, O polisakkarit zincirinin kor bölgesi şekerlerini içermeyen formudur. Poly B ise siklik D-glukanlarından oluşan düşük molekül ağırlıklı bir şekerdir (38).

*Brucella* spp.'in diğer önemli virulans faktörleri OMP'lerdir. OMP'ler grup 1 (88-94 kDa), grup 2 (35-40 kDa) ve grup 3 (25-30 kDa) olmak üzere üç gruba ayrılmışlardır. Grup 2 proteinleri aynı zamanda porin proteinleri olarak da bilinmektedir. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin tersine, *Brucella* spp.'in dış membranı fosfoditiletalonamin yerine fosfoditilkolinden zengindir. Bu özellik nedeni ile bakterinin LPS tabakasının polimiksin gibi antibiyotiklere bağlanamadığı ve dolayısı ile sözkonusu antibiyotiklere karşı bakteride direnç geliştiği ileri sürülmektedir (39,40,46). OMP2 porin protein profillerinin *Brucella* türlerini sınıflandırmada kullanılabileceği bildirilmektedir (39). Tiyonin duyarlılığı *Brucella* cinsi mikroorganizmalarının tür ve biyotip tanısında kullanılan birkaç testten biridir. Tiyonin minimum 0.7 nm çapında hidrofilik bir boyadır. Porin kanallarının bu boyanın penetrasyonunda başlıca rol oynadığı ileri sürülmektedir. Tiyonin varlığında üreme kabiliyetinin olmayışının OMP2a geninden 108 bp'lik bir segmentin delesyonuna bağlanmaktadır (47).

*Brucella* yüzeyindeki OMP'lerin yanı sıra asıl *Brucella* protein antijenlerinin büyük kısmı hücre içinde bulunur (29). Bu bölgede yer alan proteinler (A1, A2, A5,.....X antijenleri) deri deneylerinde rol oynarlar (1).

OMP'lerin hücresele bağışıklıkta LPS antişjenlerin ise humoral bağışıklıkta rol aldıkları belirtilmektedir (39). Birçok çalışmada saf ribozomal preparasyonların hem antikorları hem de hücre-aracılıklı immün yanıtı uyardıkları ve *Brucella*'nın patojenliğine karşı koruma sağladıkları ortaya çıkarılmış, günümüzde ribozomal proteinlerin immünolojik olarak önemli bileşenler oldukları tespit edilmiştir (29).

## EPİDEMİYOLOJİ

### Coğrafişik Yayılım

Bruselloz, dünyanın pek çok yerinde görülebilen ve bazı ülkelerde endemik olan bir zoonozdur. Özellikle Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri, Arabistan yarımadası, Hindistan, Orta ve Güney Amerika ülkeleri gibi gelişmekte olan ülkelerde ve bölgelerde yaygındır (2,3,6,48). Epidemik olgular, hayvan yetiştiriciliğı ve o yöredeki kişilerin örf ve adetleriyle bağlantılı olup o bölgedeki hayvan kaynaklarıyla yakından ilişkilidir (49).

Gelişmekte olan ülkelerde brusellozun önemli bir sağlık sorunu olmaya devam ettiğı ve prevalansının tam olarak bilinmediğı kabul ediliyor (1). DSÖ'nün verilerine göre her yıl 500.000'den fazla yeni olgu saptanmaktadır (6,12,51). Gerçek insidans bilinmemekle birlikte endemik bölgelerde insan brusellozunun her 100.000 kişide >0.01 ile < 200 arasında değıştiğı bildirilmektedir (29). Japonya, bazı Doğu ve Kuzey Avrupa ülkelerinde tamamen eradike edildiğı bildirilmektedir. En büyük başarı, endüstri ülkelerinde, sığır hastalığının eradikasyonu ile kazanılmıştır (6,29). Yine de bu ülkelerde hastalık mesleksel yolla ve seyahatle alınabilmekte, ayrıca kaza eseri laboratuvarında çalışma sırasında bakteri ile infekte olunduğı bilinmektedir (1,2,50). Birçok ülke kontrol programına sahip olmasına rağmen, *B. melitensis* enfeksiyonu daha zor kontrol edildiğinden eradikasyon çalışmalarında başarı sınırlı kalmıştır (29).

Türkiye'de özellikle Ankara ovasında, Konya yöresinde, Güneydoğu Anadolu'da, Diyarbakır ve Urfa yörelerinde yaygındır (2,48). Hastalık kırsal kesimde büyük şehirlere oranla daha sık görülmektedir (49). Ataman-Hatipoğlu ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmada; olguların çoğunun kırsal kesimde yaşadığı (%76); hastalığın, kent merkezlerine oranla taze peynir tüketiminin, hayvancılıkla uğraşmanın ve hayvanlarla temasın daha yaygın olması nedeniyle kırsal kesimde daha sık görüldüğünü söylemişlerdir (4).

## Kaynak

İnfeksiyonun rezarvuarı oldukları bilinen koyun, keçi, sığır, domuz gibi çiftlik hayvanlarının yanısıra, köpekler ve vahşi hayvanlar da insanlar için önemli kaynakları oluştururlar. Ama bu hayvan türleri arasında hastalığı bulaştırma riski açısından; koyun ve keçilerde görülen *B. melitensis* insan için oldukça patojen bir türken sığırlarda rastlanılan *B. abortus*' un patojenitesi daha azdır, köpeklerde görülen *B. canis* ise daha hafif seyirli hastalık yapar (1). *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* ve *B. canis* insan brusellozuna neden olan dört türdür. *B. melitensis* için primer rezervuar koyun ve keçiler iken bazı ülkelerde develer de önemli rezervuardır. Sığırlarda düşüklere ve steriliteye, insanlarda ise ondülan ateşe neden olan *B. abortus* yaygın olarak sığırlarda bulunsa da deve, buffalo, bizon ve yak gibi hayvanlarda da görülür. Hastalığın prevelansı ve insidansı ülkeden ülkeye çok fazla değişkenlik gösterse de; *B. abortus* tarafından meydana gelen sığır brusellozu dünyada en yaygın şeklidir. Ancak insanlarda, *B. melitensis*'in neden olduğu ovine/caprine brusellozu, klinik olarak çok daha önemli bir hastalık olarak görülüyor. *B. suis* evcil ve yabani domuzlarda bulunabildiği gibi özellikle *B. suis* biyotip 2 yabani tavşanlarda, *B. suis* biyotip 4 (*Brucella rangiferi*) subarktik bölgelerde Ren geyiklerinde de bulunabilir. *B. melitensis* ve *B. suis* türleri de sığırları infekte edebilir ve sürü içerisinde yayılabilirler ama çok nadir olarak düşüğe neden olurlar (6). *B. canis* primer olarak "kennel-raised" köpeklerde infeksiyona neden olur. *B. neotomae* yaygın olarak "desert wood rat"larda, *B. ovis* koyunlarda bulunur, koçlarda ise epididimit oluşturur (3,6,28,29). Ayrıca haşerelerin barsaklarında da etkeni taşıdıkları belirtilmiş ve Wolleman çalışmalarında karasineklerin en az 24 saat bakteri taşıdığını göstermiştir (16).

Dünyanın çeşitli bölgelerindeki araştırmacılar ülkelerindeki mevcut *Brucella* tür ve biyotiplerini saptamışlar (29,48). Buna göre Ürdün'de Aldomi ve ark. *B. melitensis* biyotip 3 ve biyotip 1, İtalya' da Tolari ve ark. *B. melitensis* biyotip 2, Suriye'de Mustafa ve ark. her üç biyotipin de ülkelerinde görüldüğünü belirtmişlerdir. Crichton ve ark. yaptıkları çalışmada Avustralya'da 1981-1985 yılları arasında en yaygını *B. abortus* biyotip 1 olmak üzere *B. abortus* biyotip 2 ve 4, *B. melitensis* biyotip 3, *B. suis* biyotip 1 ve *B. ovis* tespit etmişlerdir. Ülkemizde ise Erdoğan ve ark. (54) Trakya bölgesinde *B. melitensis* biyotip 1,2,3; Erdenliğ ve ark. (55) koyun atığı örneklerinde *B. melitensis* biyotip 1 ve 3; Bolca ve ark. (5) İstanbul, Edirne ve Kayseri'den elde ettikleri örneklerde *B. melitensis* biyotip 1 ve 3; Şimşek ve ark. (48) İçanadolu Bölgesi'nde *B. melitensis* biyotip 1 ve 3; Özkurt ve arkadaşları Erzurum bölgesinde yaptıkları çalışmada *B. melitensis* biyotip 1 ve 3 tespit etmişlerdir (48). Tüm bu

çalışmalar Türkiye’de insan brusellozunda en sık etkenin *B. melitensis* ve en yaygın *B. melitensis* biyotipinin biyotip 3 olabileceği görüşünü desteklemektedir (5,48,54,55).

### **İnsidans**

Tüm epidemiyoloji çalışmalarına rağmen insan ve hayvan vakalarının bildirim yetersizlikleri, subklinik olguların varlığı, çiftçilerin hayvan düşüklerini saklama eğiliminde olmalarından dolayı insan ve hayvanlardaki bruselloz insidansını kesin olarak tespit etmek mümkün olamamaktadır (4,49). Ülkemizde bruselloz seroepidemiolojisi konusunda 1987 yılında yapılan en kapsamlı çalışmada yaklaşık 70.000 örnek incelenmiş, normal popülasyondaki seropozitiflik %1.8 bulunmuştur. Bu oran risk gruplarında %6 olarak tespit edilmiş. En yüksek pozitifliğin Diyarbakır, Konya ve Antalya yörelerinde olduğu belirlenmiştir (4,6). Yine ülkemizde hayvanlar arasında yapılan serolojik sürveyans çalışmalarında bruselloz prevalansı 1989 yılında sığırlarda %3.56, koyunlarda %1.26, 1990 yılında sığırlarda %1.2, koyunlarda %2.08, 1991 yılında sığırlarda %1.01, koyunlarda %1.83 olarak saptanmıştır. İyisan ve ark.’nın 2000 yılında yaptıkları çalışmada bruselloz prevalansı sığırlarda %1.43, koyunlarda %1.97; Ceylan ve ark.’nın 2002 yılında Van’ın bazı köylerinde yaptıkları araştırmada sığırlarda %20.9, koyunlarda %19.6 ve keçilerde %21.5; Ataman-Hatipoğlu ve ark.’nın Ankara yöresinde yaptıkları çalışmada sığırlarda %10, atık yapmış koyunlarda ise %13.8 olarak tespit edilmiştir (4,48).

### **Bulaşma yolları**

Bruselloz, infekte hayvanların etleri, süt, idrar gibi vücut sıvıları, infekte süt ile hazırlanan süt ürünleri ve infekte hayvanların gebelik materyali, kaza sonucu laboratuvarından inhalasyonla, göz konjunktivasından, nadiren de cinsel temas ile ya da inkübasyon döneminde alınmış kan ile transfüzyon sonucu bulaş söz konusu olabilir (1-4,49). İnfekte hayvanın etinin dalak karaciğer gibi retiküloendotelial sistem organlarının yeterince pişirilmemesi ile de bulaşabilir (2). Ülkemizde en çok bulaş çiğ süttten yapılan peynir ve tereyağla olur (2,4). Taşova ve ark.’nın (53) yaptığı 238 olgunun değerlendirildiği bir çalışmada, olguların %63’ünde olası kaynağın taze peynir tüketimi, %37’sinde ise direkt hayvan teması ve hayvanlardan elde edilen ürünlerle bulaşma olduğu; Ataman- Hatipoğlu ve ark.’nın (4) yaptığı çalışmada ise %94,5’inde taze peynir tüketimi, %70,3’ünde ise hayvancılıkla uğraşma ve hayvanlarla direkt temas olduğu tespit edilmiştir. Şimşek ve ark.’nın (48) yaptığı çalışmada ise %91,3’ünde taze peynir tüketimi, %52.7’sinde ise hayvancılıkla uğraşma öyküsü saptanmıştır.

### Yaş cinsiyet ve meslek grubuna göre dağılım

Erkekler, hayvanlarla iş gereği daha fazla temas ettikleri için daha sık hastalanmaktadır. ABD’de bruselloz kadınlara oranla erkeklerde üç kat fazladır (49). Yaş grubu olarak 20 ila 40 yaş grubu erkekler en yüksek oranı teşkil etmektedir (2,49). Ülkemizde Ataman-Hatipoğlu ve ark.’nın yaptığı çalışmada en fazla olgunun 21-30 ve 51-60 yaş gruplarında olduğu görülmüş (4). Şimşek ve ark.’nın yaptığı çalışmada ise yaş ortalamaları 42.7 yıl ve yaş dağılımı 15-75 yaş arasında tespit edilmiştir (48). Hastalık hayvanlarla direkt teması olan veteriner, hayvan yetiştiricisi, kasap, çiftçi, çoban ve mezbaha işçilerinde daha sık görülmektedir (2,4,48,49).

### Mevsimplere göre durum

İneklerle ilişkili sığırların ineklerin gebe buldukları zamanla bağlantılı olarak hastalandığı dönemler ilkbaharla yaz aylarının başlangıcıdır. İnsan vakalarının çoğu ise yaz aylarında görülmektedir. Akut infeksiyon bu aylarda görülmektedir. Bunun süt ve ürünlerinden meydana gelebileceği ve yaz aylarında seyahat nedeniyle hijyenik olmayan süt ve benzeri yiyeceklerin yenmesidir. Kışa nazaran yaz aylarında olgularda dört kat artma izlenmektedir (2,4,16).

Ülkemizdeki yıllara göre olgu ve ölüm sayıları, mortalite ve morbidite hızları Tablo 5’de gösterilmiştir (57).

**Tablo 6: Türkiye’de yıllara göre bruselloz (57)**

Yıllar	Olgu sayısı	Morbidite hızı (100.000)	Ölüm sayısı	Mortalite hızı (100.000)
1975	69	0.17	0	0.00
1976	69	0.17	0	0.00
1977	62	0.15	0	0.00
1978	72	0.17	0	0.00
1979	157	0.36	0	0.00
1980	186	0.42	0	0.00
1981	438	0.96	1	0.02
1982	676	1.45	1	0.02
1983	618	1.29	1	0.02
1984	1135	2.31	0	0.00
1985	1177	2.34	0	0.00
1986	1563	3.03	1	0.02
1987	1809	3.42	1	0.02
1988	2356	4.35	1	0.02
1989	3145	5.48	0	0.00
1990	5003	8.69	2	0.03

1991	4658	8.07	4	0.07
1992	6197	10.49	0	0.00
1993	6795	11.25	2	0.03
1994	8383	13.57	0	0.00
1995	8506	13.46	9	0.14
1996	9480	15.11	0	0.00
1997	11812	18.53	1	0.02
1998	12330	19.03	0	0.00
1999	11462	17.41	3	0.05
2000	10742	16.07	6	0.09
2001	15510	22.45	2	0.03
2002	17765	25.23	1	0.01
2003	14572	20.30	0	0.00
2004	18264	25.67	2	0.03
2005	14644	20.32	1	0.01

Vaka ve ölüm sayıları rutin bildirim sisteminden elde edilmiştir. Hızların hesaplanmasında kullanılan nüfuslar, Devlet İstatistik Enstitüsü tarafından yapılan projeksiyonlardır.

## PATOGENEZ

Virulan *Brucella* türleri, hem fagositik hem de non-fagositik hücreleri infekte eder. Bakterinin fagositoz özelliği olmayan hücrelere yerleşme mekanizması açıklanamamış ve daha çok kaba endoplazmik retikulum içinde lokalize oldukları görülmüştür. S-LPS'e sahip *Brucella* bakterisi olmayana göre polimorfonükleer ve mononükleer lökositler içinde daha kolay canlılığını sürdürür (27,29). Fagositik hücrelerde bakterisidal yanıtlardan kaçınmak ya da onları baskılamak için; Adenin ve 5'-Guanin monofosfat (AMP, GMP) üretilmesi sonucu, nötrofillerdeki myeloperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halojenür sisteminin ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) üretiminin inhibisyonu; makrofajlardaki fagozom-lizozom füzyonunun engellenmesini sağlayan maddelerin salınımı ile nötrofil degranülasyonunun engellenmesi; Cu-Zn superoksid dismutaz enzimi salgılayarak, nötrofillerdeki oksidatif antibakteriyel etkenin önlenmesi mekanizmalarını kullandıkları düşünülmektedir (3,18,27,29).

*Brucella*'nın en önemli virulans faktörü S-LPS'dir (3,18,42). Non-smooth suşlarda virulans düşüktür ve normal insan serumu ile öldürülmeye daha hassastırlar. Non-smooth LPS'e sahip *B. canis* ve *B. ovis* suşları; sınırlı konakçı yanıtına ve diğer türleri sınırlı oranda infekte etme kapasitesine sahiptirler. *B. abortus*'un sığırlarda uterusu yerleşmesinde fetal dokularca sentezlenen ve bir karbonhidrat olan eritritolün etkisi fazladır. Diğer hayvanlarda bu substratın sentezi oldukça azdır (3,18). Farklı *Brucella* türlerinin farklı konakçı yanıtına sebep olabileceği gösterilmiştir. *B. abortus* granülomu indüklerken, *B. melitensis* ve *B. suis* doku



abseleri oluşturmaktadır (15,18). Genel olarak *B. melitensis* ve *B. suis* insanlar için *B. abortus* ve *B. canis*'ten daha virulandırlar (42).

*Brucella* türlerinin makrofajlardaki yaşamı, moleküler ağırlıkları 17, 24, 28, 60 ve 62 kDa olan proteinlerin senteziyle de ilişkilidir. 62 kDa proteini, GroEL Hsp62 homologuna tekabül eder ve 60 kDa proteini bunun asit indüklenmiş bir varyantıdır. 24 kDa proteini asit indüklenmiş olup, yapımı asidik ortamlarda (<pH 4) bakteriyel yaşam ile korele olmaktadır. 17 ve 28 kDa proteinler makrofajlarda spesifik olarak indüklenmiş proteinler olup intraselüler yaşam ile ilişkilidirler (29).

*Brucella*; deri (derideki çatlak çizikler), konjunktival yol, infekte aerosollerin solunması ile hava yolu veya sindirim yolundan organizmaya girdikten sonra ilk üremesini bölgesel lenf bezlerinde (mezenterik, aksiller, servikal veya supraklaviküler) yapar (2,6,42). Bakteri kan yoluyla da yayılabilir ve böylece dalak, kemik iliği, kemik, böbrek, MSS, endokard, akciğer gibi hemen her organda yerleşebilir. *Brucella*'lar polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinde onlarda tahrip edilmeden kalabilirler ve çoğalabilirler (6,15,27). Özellikle karaciğer, dalak ve kemik iliğinde epitelooid hücreler, yabancı cisim ve Langhans tipi dev hücreler, lenfositler, plazma hücreleri ve mononükleer hücrelerle çevrili granülomlar, brusellozdaki karakteristik histopatolojik görünümü oluşturur (15).

## KONAK İMMÜNİTESİ

Brusellozda hem hücresel hem de humoral immün yanıt oluşur (6,42). Ama asıl savunma mekanizması hücre aracılıklıdır (37,42). Koruyucu immünite protein yapıdaki antijenler tarafından uyarılan makrofajların T-hücrelerini aktive etmesiyle sağlanır. Uyarılmış lenfositlerden salgılanan lenfokinler (IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  gibi) bir yandan makrofajları aktive ederken diğer yandan da bakterinin öldürme yeteneğini artırır (27,42). Hücre-aracılıklı immünitenin başlamasını takiben, *Brucella* protein antijenlerine karşı gelişen geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucunda oluşan granümatöz lezyonların infeksiyonun sınırlanmasında önemli olduğu düşünülüyor (18,42).

Humoral immün yanıt reenfeksiyona karşı korunmada etkilidir (18). LPS'e karşı gelişen antikolar opsonizasyon sağlayarak bakterinin fagositozunu kolaylaştırır (27,42). Akut infeksiyonda önce ilk haftada saptanan IgM sınıfı antikolar meydana gelir. IgG sınıfından antikolar hastalığın ikinci haftasından başlayarak artış gösterirler (3,6,18,42). IgG sınıfı antikolar tedavi edilmeyen olgularda en az bir yıl yüksek kalır. Tedaviye yanıt veren olgularda

ise tedavi başlangıcından itibaren altıncı aya doğru kaybolurlar ya da minimale inerler. Bazı olgularda düşük titrelerdeki IgM'ler aktif reaksiyon olmaksızın aylar ya da yıllarca kalır. IgG antikorların titresindeki hızlı düşüşün tedaviye yanıtın bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Bu antikorların titrelerinin devam etmesi ya da yeniden yükselerek ortaya çıkması nüksü veya kronik infeksiyonu akla getirmelidir (2,3,6,18,58).

Brusellozda nüks ve tekrarlayan infeksiyonların, konakçının immün yanıtı ile organizmanın virulansı arasındaki denge ile kontrol altında tutulduğu düşünülmektedir (27).

## **KLİNİK ÖZELLİKLERİ VE KOMPLİKASYONLARI**

Bruselloz; başlangıçta genel infeksiyon belirtileri veya septisemi ile, daha sonra etkenin çeşitli organlara yerleşmesi sonucu organ tutulumları ve komplikasyonlarla seyreden sistemik bir hastalıktır (1,2,4). Hastalığın klinik belirtileri bu yüzden oldukça değişkendir (26). Hastalar 2-3 haftalık inkübasyon periyodunu takiben titremelere yükselen ateş, gece terlemesi, halsizlik, baş ağrısı, miyalji, artralji, kilo kaybı gibi nonspesifik yakınmalarla hekime başvururlar (3,27,42). Bruselloz klinik olarak subklinik, akut (8 haftadan kısa), subakut (8-52 hafta) ve kronik (52 haftadan uzun) bir seyir gösterir (6,27).

*Brucella* infeksiyonları, akut sistemik belirtilerinin yanısıra veya bunlar olmadan, spesifik organ tutulumu ile de ortaya çıkabilir. Hastalık hemen hemen tüm organları tutarak komplikasyonlara neden olabilir (58). Spondilit (59), menenjit (60), pnömoni, ampiyem, peritonit, hepatik granülom, epididimit (61), orşit (61,62), prostatit (63), endokardit (60,64,65), eritema nodozum tarzı deri döküntüleri (66), anemi (67), troidit (61), nörobruselloz (68) gibi tutulan organlara yönelik komplikasyonlar görülür (2,18,27,42,). Brusellar endokardit bruselloza bağlı ölüm nedenlerinin çoğunluğunu oluşturur (27,42,64). Ülkemizde en fazla artrit, meningoensefalit, yüksek ateş tablosu ile görülmektedir (66).

## **TANI YÖNTEMLERİ**

Brusellozun klinik bulgu ve belirtilerinin çok fazla değişken olması, özellikle kronik ve subklinik infeksiyonlarda semptomların özgül olmayışından tanıda sorunlar yaşanır. Tanı öykü, kültür yöntemleri ve serolojik testlerle konulmaktadır (69).

Hekimin alacağı detaylı öykü (meslek, enzootik bölgelere seyahat, hayvanlara temas, taze süt ve süt ürünlerinin tüketimi) tanıda oldukça önemlidir (3). Rutin laboratuvar testleri nonspesifik olup tanıda yardımcı değildir (27). Bu testlerle; lökosit sayısı normal olmakla

birlikte, bazen lökopeni bazende lökositoz saptanabilir. Hastanın lökosit formülünde hafif bir lenfomonositoz bulunabilir. Bazı kronik vakalarda anemi, trombositopeni de görülebilir. Eritrosit sedimentasyon hızı genellikle orta derecede artmıştır. Serum transaminazları genellikle yükselmiş bulunur (2,6,27).

### **BAKTERİYOLOJİK TANI**

Kesin tanı, etkenin kan, kemik iliği ve diğer dokulardan izole edilmesi ile konur (18). Etken en sık olarak kan ve kemik iliği kültürlerinden izole edilir (70). Kemik iliğinden etkenin izolasyonu kana göre daha yüksek orandadır (3,18,50,70). Gotuzzo ve ark., klinik bruselloz tanısı alan 50 hastada kemik iliği kültürlerinde %92, kan kültürlerinde %70 pozitiflik saptamıştır (70,71). Laboratuvar çalışanları, *Brucella* biyogüvenlik seviyesi 3 olan bir mikroorganizma olduğundan risk altındadır ve bu nedenle kültür ekimlerinin güvenlik kabininde yapılması gerekir (70). İzolasyonda sıvı, katı ve seçici besiyerleri kullanılır. Kan ve BOS gibi içinde az bakteri bulunan materyaller sıvı besiyerlerine ekilmelidir (16). Kan ve kemik iliği örneklerinin Castenada şişelerine ekilmesi tavsiye edilir (70,23). Bunun dışındaki örneklerin ekiminde ve sıvı besiyerlerindeki üremelerden sonraki pasajlarda katı besiyerleri kullanılmalıdır (16). Günümüzde otomatize kan kültürü sistemlerinde (BACTEC kan kültürü) *Brucella* bakterilerinin büyük çoğunluğu 5- 7 gün gibi kısa bir inkübasyon süresi sonunda izole edilebilirler (50,70,73).

*Brucella* agar, serum dektrozlu agar, gliserozlu dektrozlu agar, patates agar, triptikaz soy agar kullanılan besiyerleridir. Ekimler çift yapılarak birisi normal atmosfer koşullarında, diğeri %5-10 CO<sub>2</sub>'li atmosferde üretilmelidir (16,23). İlk izolasyonda bakteriler yavaş ürediklerinden 30 gün bekletilmeden, kültürler olumsuz kabul edilmez ve atılmaz (23). *Brucella* bakterilerinin kolonilerine benzeyen kolonilerden saf kültür yapılır. Direkt gram boyamanın yararı incelenen örneğe göre değişir (6). Gram boyama yöntemine, H<sub>2</sub>S ve üreaz oluşturma sürelerine, katalaz ve oksidaz deneylerine, CO<sub>2</sub>'li ortama ihtiyaçlarına, karbonhidrat ve aminoasitleri utilizasyonuna, boyalarda üreme özelliklerine dayanılarak identifiye edilirler (70,71).

### **SEROLOJİK TANI**

Brusellozun tanısında ilk başvurulması gereken işlem bakteriyolojik kültür yöntemidir. Ancak incelenecek örneklerde etkenin üretilebilmesi için materyalin hastalığın belirli dönemlerinde alınmasının gerekliliği, etken izolasyonunun uzun süre alması, kronik olgularda kültür yönteminin her zaman sonuç vermemesi ve kültür yöntemlerinin her laboratuvar

bulunmayan bazı özel koşulları gerektirmesi nedeniyle indirekt tanı tetkiklerine başvurulmaktadır. Ayrıca veterinerlik alanında, hem çok sayıda hayvanın taranması için hem de uygulanan aşının etkinliğini denetlemek için yapılan alan çalışmalarında serolojik testler kullanılmaktadır (1).

*Brucella* türlerine karşı özgül antikorların tespitinde kullanılan serolojik testlerin duyarlılığı %65-95 arasındadır. Ancak özgüllüğü, brusellozun endemik olduğu bölgelerde sağlıklı popülasyonda da antikor prevalansının yüksek olarak saptanabilmesinden dolayı düşüktür (69).

Laboratuvarlarda en sık kullanılan seroloji testleri: Serum Aglütinasyon Testi (SAT), 2-Merkaptoetanol Tüp Aglütinasyon Testi (2-ME Testi), *Brucella* Coombs Testi, Rose Bengal Testidir (2).

### **Serum Aglütinasyon Testi (SAT) (Wright Aglütinasyon Testi)**

Serolojik testler arasında en yaygın kullanılanıdır (3,27,69). Ucuz olması, özel aletlere gerek olmaması gibi avantajlarının yanında, 2 gün sürede sonuç vermesi, tek başına akut, subakut ve kronik infeksiyonu ayırt edememesi, blokan antikorlara bağlı yanlış negatif sonuç alınması ve bazı mikroorganizmalara karşı çapraz reaksiyon göstermesi gibi olumsuzlukları da vardır (26,69).

Aglütinan antikorların total miktarı (IgG + IgM) değerlendirilmektedir (2,42). SAT testinde hasta serumunun katlı seri dilüsyonları yapıp üzerine eşit miktarda standart *Brucella* antijeni ilave edilir. 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra, aglütinasyonun tüpün dibinde yaygın kümeleşme şeklinde görülmesi ve sıvının tamamen berrak olması pozitif sonuç olarak değerlendirilir (1). Olası bir prozon olayını gözden kaçırmamak için hasta serumu en az 1/1280 oranında sulandırılmalıdır (2,27). Serum aglütinasyon titresi 1/160 dilüsyon üzerinde ise aktif infeksiyonu gösterir (3,58).

### **2- Merkaptoetanol (2- ME) Aglutinasyon Testi**

SAT testinde hangi immünglobülin sınıftan olduğu saptanamayan antikorların sınıflarını ayırmak için kullanılan basit bir yöntemdir. Bu yöntem IgM pentamerinin disülfid bağlarının indirgenmesine dayanır (58,69,70).

Hasta serumu 2-Merkaptoetanol veya dithiothreitol ile serum muamele edildiğinde IgM pentamerinin disülfid bağları parçalanır. IgM molekülü aglütinasyon aktivitesini kaybeder ama

IgG molekülü etkilenmez (58). Böylece bu işlemde tespit edilenler IgG antikorlarıdır (1,69). Tümtürk ve ark. (69) yaptıkları çalışmada; 2-ME Testi'nin tanıda çok daha önemli olduğunu ancak kronik olgularda tedavi takibinde özel bir yarar sağlamadığını söylemişlerdir.

### **Coombs Testi**

Özellikle düşük titrede antikor içeren veya negatif sonuç alınan subakut ve kronik bruselloz olgularında SAT negatif sonuç verebilmektedir. Bu hastaların serumları blokan antikorlar açısından araştırılmalıdır (1,27).

SAT deneyinde aglütinasyon vermeyen tüplerdeki bakteriler, tuzlu su ile üç kez yıkandıktan sonra, her tüpün üzerine birer damla Coombs serumu (anti- insan serum globulini) damlatılır (2). Ortama ilave edilen Coombs serumu antikorlar arası köprüler kurarak gerçek pozitifliğin ortaya çıkmasını sağlar (1).

### **Rose Bengal Testi**

*B. abortus* 99S suşunun boyalı antijen olarak kullanıldığı bir lam aglütinasyon testidir. Lam üzerine 0,03 ml antijen ve aynı miktarda hasta serumu damlatılır, 4 dakika süre ile karıştırılıp aglütinasyon olup olmadığı değerlendirilir (2,72).

### **İmmüncapture Aglütinasyon Testi (Brucellacapt)**

Blokan antikorların araştırılması için Coombs Testine ihtiyaç vardır. Prezon olayının ortadan kaldırılması için dilüsyonların oldukça ileri oranlarda yapılması gerekmektedir (2,27,58). Son yıllarda "sandwich ELİSA" sistemine dayanan İmmüncapture Aglütinasyon Testi kullanıma girmiştir. Bu test tüp aglütinasyonu ve Coombs anti-*Brucella* Testini bir arada yapmaktır ve *Brucella*'ya karşı oluşan IgG, IgM, IgA antikorlarını da tespit eder. Brusellozun Brucellacapt yönteminde, kuyucuklar insan kaynaklı IgG, IgM, IgA antikorlarına karşı (Coombs antikorları) kaplıdır. Brucellacapt; kuyucuklarda gerçekleşen ve Coombs antiserumu ile yapılan *Brucella* aglütinasyon testidir. Brusellozun klinik takibinde 1/160 ve daha yüksek titreler önemlidir. Bu titreyi değiştirebileceği için inkomplet antikorların da tespiti önem kazanmaktadır. İmmüncapture Aglütinasyon Testi'nin blokan antikorları da yakalayarak yüksek titrede antikor tespit etmesi; brusellozun tanı ve takibinde, tedavinin izlenmesi açısından güvenle kullanılabilceğini düşündürmektedir (74).

Son yıllarda SAT ve Coombs Testinin bir arada yapılması esasına dayanan İmmüncapture Testi'nin de kullanımı önerilmektedir (74). Ayrıca Radioimmünoassay (RİA), İndirekt Hemaglütinasyon Testi (İHA), Floresan Antikor (FA) ve ELİSA testleri yapılmaktadır (34).

Yine brusellozun hızlı tanısında kemikiliği aspirasyonu ve periferik kan örnekleri ile polimerize zincir reaksiyonu [Polymerase Chain Reaction-(PCR)] çalışmalarının çok önemli sonuçlar verdiği bildirilmektedir (16,42,70). Yalnız PCR çalışmalarının antibiyotik kullanımından önce yapılması önerilmektedir (16).

## **TEDAVİDE ETKİLİ ANTİBİYOTİKLER**

*Brucella* cinsi bakteriler birçok antibiyotiğe in vitro duyarlıdır ancak tedavide başarı, ilaçların kombine kullanılmasına ve tedavi süresinin uzun tutulmasına bağlıdır (6,8). Tedavi rejiminin seçimi ve antimikrobiyal tedavinin süresi, fokal hastalığın varlığına ve hastanın yaş, gebelik, alerji, renal yetmezlik gibi şartlarına bağlı olarak seçilmelidir (27,75). *Brucella*'lar hücre içi mikroorganizmalar olduğundan kombinasyonda kullanılan antibiyotiklerden en az birinin makrofajlara yüksek oranda penetre olan ve asidik bir ortam olan fagolizozomların içinde sürekliliğini ve etkinliğini koruyabilen antibiyotik olması gerekir (10,42,76). Ancak asidik pH etkinliklerinin azalmasına neden olur (77).

İlk seçilecek tedavi rejimi, doksisisiklin 45 gün 2x100 mg + streptomisin 14 gün 1x1 gr İM kombinasyonudur. Streptomisin toksisitesi nedeniyle gentamisin veya netilmisin tedavinin ilk 7 gününde 5-6mg/kg kullanılabilir (27,75). Doksisisiklin+streptomisin tedavisi nüksü en düşük tedavi rejimidir (27). İkincisi ise doksisisiklin 2x100 mg+rifampisin 1x600-900 mg 45 gün süreyle kombine kullanımudur (27,75). Bu iki rejim "Centers for Disease Control and Prevention"ın bruselloz için önerdiği tedavi rejimleridir (27).

Sekiz yaş altı çocuklarda, gebelik ve emzirme dönemindeki kadınlarda tedavide tetrasiklinlerin kullanımı kontrendikedir (27,75). Streptomisin ise fetüste 8. sinir hasarı yapabileceğinden gebelerde kullanılmamalıdır (2,27). Sekiz yaş altı çocuklarda; rifampisin+kotrimaksazol 45 gün ya da rifampisin+gentamisin/ netilmisin kombinasyonu, gebe ve lohusalarda rifampisin 45 gün kullanılmalıdır (75). Özellikle hamilelikte rifampisinle kombine edilebilecek bir diğer ilaç da doku penetrasyonu iyi olan azitromisindir (8). Sekiz yaş üstü çocuklar yetişkin gibi değerlendirilir (27).

DSÖ'nün en son önerdiği tedavi rejimi en az altı hafta süreyle doksisisiklin (200 mg/gün) ve rifampisin (600-900 mg/gün) kombinasyonudur. Alternatif olarak streptomisin (1 g/gün, intramüsküler, 14 gün süreyle) ve doksisisiklin (200 mg/gün, 6 hafta süreyle) veya tetrasiklin (2 g/gün, 4 eşit dozda, 6 hafta süreyle) kombinasyonu önerilmektedir (18).

### **Doksisiklin**

Doksisiklin; bakteri hücrelerinde, ribozomal 30S subünitine reversibl olarak bağlanan ve aminoaçil-tRNA'nın, mRNA-ribozom kompleksine bağlanmasını engelleyen tetrasiklin grubu antibiyotiklerdendir. Böylece uzayan peptid zincirine yeni aminoasit eklenemez ve bakteri hücrelerinde protein sentezi durur (78,79).

Doksisiklin lipofilik özelliğe sahip olduğundan, dokulara iyi penetrasyon gösterir. Oral yoldan uygulandığında %90-95 oranında absorbe olur. BOS'a plazmadakinin %10 veya daha azı konsantrasyonda geçer; bu nedenle BOS konsantrasyonu yetersizdir. Tetrasiklinler fetusa ve anne sütüne geçer, bu nedenle gebelerin ve süt veren annelerin sağaltımında kullanılmaması önerilir (79,80).

Bruselloz tedavisinde streptomisin veya rifampisin ile kombine edilerek kullanılırlar (79).

### **Streptomisin**

Streptomisin bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek ve mRNA'daki genetik bilginin doğru okunuşunu bozarak hızlı bakterisidal etki gösteren aminoglikozid grubu antibiyotiklerdendir (81). Kimyasal olarak oldukça stabil, geniş antibakteriyel spektruma sahip, yıllarca denenmiş olan, allerjik yan etkileri az görülen, çabuk bakterisidal etkili ve beta laktam antibiyotiklerle sinerjik etkili antibiyotikler oldukları için klinikte geniş kullanım alanı bulmuşlardır (82).

Streptomisinler, polar yapıları nedeniyle çok az lipofilik olduklarından sindirim sisteminden absorpsiyonları çok azdır. İntra müsküler uygulandıklarında ise 30-60 dakikada en yüksek plazma düzeyine ulaşır. BOS'ta tedavi edici düzeylere ulaşamazlar (82).

Streptomisin, bruselloz tedavisinde tetrasiklinlerle kombine edilerek kullanılır (82).

### **Rifampisin**

Rifampisin DNA'ya bağımlı RNA polimerazı inhibe ederek bakterisid etki gösteren yarısentetik bir antibiyotiktir. Birçok bakteriye ise bakterisidal etki gösterir. Rifampisin *Brucella* cinsi bakterilere de etkilidir. Özellikle aç karnına alındığında gastrointestinal kanaldan hızlı ve tam olarak absorbe edilir. Bütün vücut dokularına iyi dağılır (83). Menenjitli hastalarda BOS'da terapötik dozlara ulaşır (78,83). Anne sütüne geçer (83).

Bruselloz tedavisinde doksisiklinle kombine olarak 6 hafta süre ile uygulanması önerilir (83).

## **Seftriakson**

Penisilinler gibi penisilin bağlayıcı proteinlere bağlanarak hücre duvarındaki peptidoglikanın sentezini önleyen ve bakterisidal etki gösteren 3. kuşak sefalosporin grubu antibiyotiktir (78,84).

Akciğer, böbrek, periton, sinoviyal, perikardiyal, plevral sıvıya ve Beyin omurilik sıvısına (BOS) iyi geçerler (8,84). Diğer önemli özelliklerinden birisi de serum yarı ömrünün (sekiz saat) uzun olmasıdır. Yenidoğanlarda serum proteinlerine yüksek oranda bağlanması nedeniyle bilirubin ile yarışa girebilir ve sarılıklı bebeklerde kernikterusa neden olabilir. Bu nedenle yenidoğan infeksiyonlarında tercih edilmez (84).

## **Kinolonlar**

Kinolonlar DNA rekombinasyonu için gerekli olan DNA giraz enzimini inhibe ederek antimikrobiyal etki gösteren ve sentetik olarak elde edilen antibakteriyel ilaçlardır (78,85,86). Çok yüksek konsantrasyonlarda RNA ve protein sentezini inhibe ettikleri ve bakteriyostatik oldukları saptanmıştır (85).

Kinolonlar lökositler ve makrofajlar içine iyi penetre olur ve nötrofil lökositlerin içindeki konsantrasyonları serum konsantrasyonlarınının 14 katına kadar ulaşır. Kinolonlar *Brucella*, *Listeria*, *Salmonella* ve *Mycobacterium* gibi hücre içi patojenlere etkilidirler (78,87,88). Kinolonlar geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteleri, oral kullanılabilirliği, yüksek doku konsantrasyonu ve intraselüler penetrasyonu nedeniyle intraselüler bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisi için uygundur (87). Ancak brusellozda primer tedavide kullanılmazlar (88).

## **KORUNMA**

İnsanlarda brusellozun önlenmesi, konakçı hayvanlarda hastalığın kontrolü veya eradikasyonuna bağlıdır (3, 27). Süt ve süt ürünlerinin hazırlanmasında ve mesleki açıdan teması önleyecek koruyucu ve hijyenik önlemlerin alınması gereklidir (27).

Hayvanlarda hastalığı önlemek amacıyla *B. melitensis* Rev-1süşundan hazırlanan canlı aşı vardır, ancak aşı koyunları *B. ovis* infeksiyonuna karşı koruyamaz. Sığırlarda ise *B. abortus* 19 süşundan hazırlanan canlı aşı kullanılmaktadır (2,27,42). Alerjik reaksiyonların gelişmesi nedeniyle insanlara canlı aşı uygulamasından vazgeçilmiştir. Ancak hayvanlar ve insanlar için aşı çalışmaları hala devam etmektedir (27).



## GEREÇ VE YÖNTEM

### TEZ ÇALIŞMASININ YAPILDIĞI YER

Teze konu olan testler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi (TÜTF) Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, testler için kullanılacak bakteri izolatlarının tür ve biyotip tayini Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde (Pendik-İstanbul) yapıldı.

### ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

TÜTF Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ocak 2002-Aralık 2004 tarihleri arasında hastalardan alınan 51 adet kan kültürü ve iki adet eklem sıvısı örneğinden, standart metotlarla izole edilen ve *Brucella* olarak adlandırılmış 53 suş çalışmaya alındı. Suşlar çalışmaya alınincaya kadar skim-milk besiyerinde derin dondurucuda,  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Derin dondurucudan çıkarılan kökenler çalışılacağı zaman skim-milk besiyerinden çikolata agara pasajlandı. Her ekim  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 48 saat inkübe edildi ve bu süre sonunda koloniler incelemeye alındı.

İzolatların tür ve biyotip tayini yapıldığında 41 adet kan kültürü ve 2 adet eklem sıvısı örneğinden alınan toplam 43 izolatın *Brucella* genusundan olduğuna karar verildi. Bu 43 izolat teze konu olan test yöntemlerinde kullanıldı. Diğer 10 kan kültürü örneğinde *Brucella* üremedi.

## ÇALIŞMANIN YÖNTEMİ

Tezde kullanılan yöntem deneysel olup bağımlı ve bağımsız değişkeni yoktur.

## BESİYERLERİ, AYIRAÇLAR, SOLÜSYONLAR VE STRİPLER

Tüm besiyeri ve solüsyonlar üretici firması tarafından önerilen yöntem ve miktarlarda hazırlanarak, pH'ı ayarlanıp otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

### Skim-milk Besiyeri

Skim-milk	100	gr
-----------	-----	----

### Çikolata Agar

Brain heart infusion agar	40	gr
Koyun kanı	40	ml
Distile su	800	ml

Besiyeri Ben-maride 75°C'ye kadar soğutulduktan sonra 40 ml defibrine steril koyun kanı ilave edildi.

### Ure Agar Base (Biolab, New Zealand)

Peptone	1	gr
Glucose	1	gr
Sodium chloroid	5	gr
Phenol red	0,012	gr
Agar	13	gr
Buffers	2	gr

### Trypticase Soya Buyyonu (TSB)

Pancreatic digest of caseing USP	17	gr
Pancreatic digest of soybean meal	3	gr
NaCl	5	gr
Saf su	1000	ml

Steril şartlarda %15 gliserin ilave edildi.

### **Trypticase Soya Agar (TSA)**

Pancreatic digest of caseing USP	17	gr
Pancreatic digest of soybean meal	3	gr
NaCl	5	gr
Agar	15	gr
Saf su	1000	ml

Steril şartlarda %15 gliserin ilave edildi.

### **Serum Dekstroz Agar (SDA)**

Trypticase soya Agar	40	gr
Distile su	900	ml
Steril sığır serumu	50	ml
Steril dekstroz solusyonu	50	ml

Besiyeri distile su içerisine katılarak Ben-Mari'de 100°C'de eritildi, pH 7,2±0.2 ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildikten sonra 56°C'ye soğutuldu. İçerisine son konsantrasyonu %5-10 olacak şekilde steril sığır serumu ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde %20'lik stok dekstroz çözeltisinden ilave edildi. Steril şartlarda %15 gliserin ilave edildi.

### **Thionin Besiyeri**

Trypticase soya Agar	40	gr
Thionin Stok Boya Solüsyonu (%0,1'lik)	20	ml
Distile su	880	ml
Steril sığır serumu	50	ml
Steril dekstroz solusyonu	50	ml

Besiyeri distile su içerisine katılarak Ben-Mari'de 100°C'de eritildi, pH 7,2±0.2 ayarlanıp otoklavda 121°C'de 20dakika steril edildikten sonra 56°C'ye soğutuldu. İçerisine son konsantrasyonu %5-10 olacak şekilde steril sığır serumu ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde %20'lik stok dekstroz çözeltisinden ilave edildi. %0,1 lik steril tiyonin stok solüsyonundan 20 ml ilave etmek suretiyle 1/50.000 (20 µg/ml) oranında tiyonin içeren besiyeri hazırlanmış oldu.

### **Bazik Fuksin Besiyeri**

Trypticase soya Agar	40	gr
Bazik Fuksin Stok Boya Solüsyonu (%0,1'lik)	20	ml
Distile su	880	ml
Steril sığır serumu	50	ml
Steril dekstroz solusyonu	50	ml

Besiyeri distile su içerisine katılarak Ben-Mari'de 100°C'de eritildi, pH 7,2±0.2 ayarlanıp otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildikten sonra 56°C'ye soğutuldu. İçerisine son konsantrasyonu %5-10 olacak şekilde steril sığır serumu ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde %20'lik stok dekstroz çözeltisinden ilave edildi. %0,1 lik steril bazik fuksin stok solüsyonundan 20 ml ilave etmek suretiyle 1/50.000 (20 µg/ml) oranında bazik fuksin içeren besiyeri hazırlanmış oldu.

### **Safranin O Besiyeri**

Tryptic soy Agar	40	gr
Safranin Stok Boya Solüsyonu (%0,5'lik)	20	ml
Distile su	880	ml
Steril sığır serumu	50	ml
Steril dekstroz solusyonu	50	ml

Besiyeri distile su içerisine katılarak Ben-Mari'de 100°C'de eritildi, pH 7,2± 0.2 ayarlanıp otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildikten sonra 56°C'ye soğutuldu. İçerisine son konsantrasyonu %5-10 olacak şekilde steril sığır serumu ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde dekstroz ilave edildi. %0,5'lik steril Safranin stok solüsyonundan 20 ml ilave etmek suretiyle 1/10.000 (100µg/ml) oranında Safranin içeren besiyeri hazırlanmış oldu.

### **Mueller Hinton Buyyon (MHB) (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, İngiltere)**

Beef, dehydrated infüsyon	300	gr
Casein hydrolysate	17.5	gr
Starch	1.5	gr

Steril edildikten sonra besiyerine steril şartlarda, %1 oranında PoliViteX ilave edildi.

**Mueller Hinton Agar (MHA) (Biolab, New Zealand)**

Peptones	19.5	gr
Kazein hidrolizat	17.5	gr
Starch	1.5	gr
Agar	17	gr

Benmaride 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra %5 defibrine steril koyun kanı ve %1 PoliViteX steril şartlarda ilave edildi.

**Oksidaz Ayıracı**

Tetrametil-p-fenylendiamin dihidroklorid (SIGMA)	0.1	gr
Distile su	10	ml

**Katalaz Ayıracı**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	ml
H <sub>2</sub> O	8	ml

**Kurşun- asetat Ayıracı**

Distile su	50	ml
Kurşun asetat	10	gr
Süzgeç kağıdı	7	mm eninde
	5	cm boyunda

50 ml kaynar su içinde 10 gr kurşun asetat eritildi. Emici süzgeç kağıtları bu eriyiğin içine kondu ve petri kutularına yerleştirilip etüvde kurutuldu (89).

**Pepton- salin Solusyonu**

Pepton	10	gr
Sodyum klorid (NaCl)	5	gr
Distile su	1000	ml
pH	7,2± 0.2	

**Akriflavin Solusyonu**

Akriflavin	5	mg
Distile su	5	ml

5 mg akriflavin tartılarak küçük vialler içerisine kondu. Gerektiğinde 1/1000 oranında (5 ml distile suyla) sulandırılarak taze olarak hazırlandı ve kullanıldı.

### **Tbilisi Faj**

Tbilisi fajı'nın RTD'nu hazırlamak için *B. abortus* 544 (biyotip 1) suşu ( Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires, CNEVA, FRANSA ) Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden (Pendik-İstanbul) alındı.

### ***Brucella* anti-serumları**

**A+M *Brucella* poliserum:** Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden (Pendik-İstanbul) alındı.

***Brucella* Monospesifik A Antisera:** Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden (Pendik-İstanbul) alındı.

***Brucella* S19 M Antisera:** Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden (Pendik-İstanbul) alındı.

**PoliViteX** (bio.Merieux)

**pH Ölçen Strip** (Phenon, Macherey-Nagel, Germany)

### **E Test Stripleri**

Doksisiklin E Test Stribi (AB Biodisk, Solna, Sweden)

Siprofloksasin E Test Stribi (AB Biodisk, Solna, Sweden)

Rifampin E Test Stribi (AB Biodisk, Solna, Sweden)

Streptomisin E Test Stribi (AB Biodisk, Solna, Sweden)

### **Kontrol Suşları Olarak Kullanılan Standart Suşlar**

1. *Brucella* tür ve biyotiplendirmesinde kullanılanlar:

1.1 Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden (Pendik-İstanbul) alınan;

<i>B. abortus</i>	biyotip 1	544	ATCC 23448
<i>B. abortus</i>	biyotip 2	86/8/59	ATCC 23449
<i>B. melitensis</i>	biyotip 1	16 M	ATCC 23456
<i>B. melitensis</i>	biyotip 2	63/9	ATCC 23457

<i>B. melitensis</i>	biyotip 3	Ether	ATCC 23458
<i>B. melitensis</i>	Rev.1		
<i>B. suis</i>	biyotip 1	1330	ATCC 23444
<i>B. ovis</i>		63/290	ATCC 25840

## 2. Antibiyotik duyarlılık tesleri için kullanılanlar:

### 2.1 TÜTF, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarında saklanan;

<i>Escherichia coli</i>			ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>			ATCC 29213

### 2.2 Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden (Pendik-İstanbul) alınan;

<i>B. melitensis</i>	biyotip 1	16 M	ATCC 23456
<i>B. melitensis</i>	biyotip 3	Ether	ATCC 23458

## ÖRNEKLERİN TANIMLANMASI

TÜTF Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda daha önce *Brucella* olarak adlandırılmış 53 suş çalışmaya alındı. Derin dondurucudan çıkarılan suşlar çalışılacağı zaman skim-milk besiyerinden çikolata agara pasajlandı. Her ekim 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda koloniler incelemeye alındı.

### ***Brucella* Genus Seviyesinde İdentifikasyon**

1. Bakteri morfolojisi: Çikolata agarda 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda üreyen mikroorganizmaların morfolojilerini değerlendirmek amacı ile Gram boyama yapıldı.

Boyamada 53 izolatın 43'ünün Gram negatif kokobasil olduğu bunların da ***Brucella*** genusuna ait olabileceği düşünüldü (19).

2. Koloni morfolojisi: *Brucella* cinsine özgü kolonilerin yapısı (2-3 mm çapında, şeffaf, yüzeyden kabarık, konveks, parlak yüzeyli koloniler) araştırıldı (16,23).

Çikolata agarda 48 saatlik inkübasyon sonunda şeffaf, yüzeyden kabarık, konveks, parlak yüzeyli koloniler oluşturan 43 suşun *Brucella* genusundan olabileceği düşünüldü. Bu koloniler morfolojik özelliklerini tam ve doğru olarak gösteren genç koloniler elde edilmesi için iki kez pasajlanıp incelemeye alındı.

3. Katalaz deneyi: Çikolata agarda üremiş olan saf *Brucella* kolonilerinden steril öze ile alınıp temiz ve kuru bir lam üzerine kondu. Bunun üzerine bir damla %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatıldı. Gaz kabarcıkları oluştuğunda deney olumlu kabul edildi.

Sonuç olarak 43 izolatımız katalaz pozitif olarak tespit edildi (16,19,24).

4. Oksidaz deneyi: Her seferinde steril distile su içinde %1'lik tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride eriyiği hazırlandı. Bu eriyik, filtre kağıdına emdirildi. Denenecek bakteri kolonisinden alınan örnekler bu filtre kağıdı üzerine sürüldü ve 10 saniye içinde mor veya mavi renk oluştuğunda deney olumlu kabul edildi.

Sonuç olarak 43 izolatımız oksidaz pozitif olarak tespit edildi (16,19,24).

5. *Brucella* anti-A+M poliserumu ile lam aglutinasyon testi: Şüpheli kolonilerden bir öze dolusu kültür ile *S Brucella* 'lara karşı hazırlanmış adsorbe olmamış poliserumdan bir öze dolusu alınarak lam üzerinde karıştırıldı ve aglütinasyonun varlığı araştırıldı (19,56).

Aglütinasyonun görülmesi izolatların *Brucella* genusuna ait bir mikroorganizma olabileceğini gösterdi.

6. Üreaz testi: Yatık üre agar besiyerinin yüzeyine saf kültürden çizgi ekimleri yapılarak araştırıldı. Tüpler oda ısısında ilk 5 saat birer saatlik aralarla ve 24 saat sonra tüplerdeki renk değişimi açısından kontrol edildiler. Rengin sarıdan pembeye dönüşümü üreaz aktivitesini göstermektedir. Bu rengin değişim zamanı belirlenerek ilgili izolatin üreyi hangi hızla parçaladığı belirlendi (hızlı, orta ve yavaş) (16,19,23,24).

Bütün izolatlarımızda değişken hızda üreaz aktivitesi saptandı.

### ***Brucella* İzolatlarının Tür-Biyotip Tayini:**

1. S ve R kolonilerin ayırımı: *Brucella* spp.'in tür tayinlerinde kültürün koloni morfolojisi önemli olduğundan, kolonilerin akriflavin solüsyonu ile aglütinasyon özellikleri incelendi (19,48,56). Bunun için taze olarak hazırlanmış akriflavin solüsyonundan bir damla bir lam üzerine konuldu ve bir öze yardımı ile birkaç koloni alınarak bu damla içinde süspanse edildi. R koloniler akriflavin solüsyonu ile hemen aglütine oldukları halde S koloniler homojen bir süspanسیون gösterirler. M kolonilerde ise ipliğimsi bir uzama oluşur (56). R ve M koloniler biyotiplendirilme testlerinde kullanılamayacağından, testler için S koloniler seçildi (48,56).



Bütün izolatlarımıza ait koloniler homojen süspansiyon yapısı gösterdiğinden S koloni olarak değerlendirildi.

## 2. Faj testi:

**2.1 Fajların RTD'nun saptanması:** Tbilisi fajı için *B. abortus* 544 suşu kullanıldı. Bu suş yatık SDA tüpüne ekilip 37°C'de 24 saatlik inkubasyona bırakıldı ve bu sürenin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplandı ve 0,5 McFarland standart bulanıklığına göre ml'sinde yaklaşık  $1 \times 10^9$  bakteri bulunacak şekilde süspansiyon hazırlandı (48,56). Steril bir svap bakteri süspansiyonuna daldırılarak SDA petrisinin bütün yüzeyine homojen bir şekilde yayılarak ekim yapıldı. Petrinin yüzeyinin kurumaması beklenirken, bu arada fajın pepton salinde  $10^{-1}$ 'den  $10^{-8}$ 'e kadar on katlı dilüsyonları yapıldı. Her bir dilüsyon için ayrı pipet kullanıldı. Yüzeyi kuruyan SDA petrisinin alt yüzeyine bir cam kalemi ile fajın dilüsyonları yazıldı. Fajın her bir dilüsyonundan SDA petrisindeki ilgili bölüme steril ve ayrı pipet uçları kullanılarak 20'şer µl damlatıldı. Petri yüzeyi kuruduktan sonra 37°C'de %5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24 saat inkubasyona bırakıldı (48,56).

Damlanın çevirdiği alanda tam bir lizisin görüldüğü en yüksek dilüsyon, fajın RTD'u olarak saptandı (48,56). Bizim çalışmamızda RTD  $10^{-5}$  olarak saptandı.

**2.2 Tbilisi fajı ile lizis:** Yatık SDA tüplerine kontrol suşlar ve testi yapılacak izolatların kültürlerinden ekilip 37°C'de, 24 saatlik inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplandı ve 0,5 McFarland standart bulanıklığına göre ml'sinde yaklaşık  $1 \times 10^9$  bakteri bulunacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Her bir bakteri süspansiyonuna daldırılan steril bir svapla SDA yüzeyine sığabildiği kadar suşu bir petride yapmak, besiyeri kaybını önlemek ve bir petride sığabilecek maksimum şerit sayısı beş olduğu için birbirine paralel olarak beş şerit halinde ekim yapıldı. Şeritlerin sol tarafına Tbilisi fajının RTD'undan, sağına 10.000x RTD'undan 20 µl damlatıldı. Petriler kuruduktan sonra %5-10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 37°C'de 4-5 gün inkübe edildiler. Sonuçlar lizis durumuna göre değerlendirildi. Kontrol suşu olarak *B. abortus* 544 ve *B. melitensis* 16M kullanıldı (19,48,56).

Her iki dilüsyonda da lizis olmaması tüm izolatların *B. melitensis* olduğunu düşündürdü.

### 3. Tür ve biyotip tanısında kullanılan yöntemler:

**3.1** Karbondioksit (CO<sub>2</sub>) gereksinimi ve hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) üretimi: İnkübasyon süresi (4 gün) sonunda üreyen her bir *Brucella* izolatından iğne uçlu bir öze ile tek bir koloni alınarak ikişer adet yatık SDA tüplerine pasajları yapıldı. Kurşun asetatlı kağıt şerit, besiyerine temas etmeyecek şekilde, tüp kenarı ile kapak arasına sıkıştırılarak yerleştirildi. Birinci tüpler %5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvde, diğerleri ise aerob koşullarda 37°C'de, 4 gün süreyle inkübe edildiler. Kurşun asetatlı kağıtlar inkübasyon süresi boyunca her gün değiştirildi (19,56). İnkübasyon süresi sonunda sonuçlar, üreme durumlarına ve kurşun asetatlı kağıtlarda oluşan renk değişikliğine göre değerlendirildi (19,48,56). Testlerde kontrol suşları olarak, CO<sub>2</sub>'e gerek duyan ve H<sub>2</sub>S pozitif olan *B. abortus* 544 ile her iki karakter yönünden negatif olan *B. melitensis* 16M kullanıldı (56).

Gerek aerobik ve gerekse %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda yatık SDA tüplerine ekimi yapılan test izolatlarının 4 günlük inkübasyonlarının ardından yatık SDA tüplerinin tümünde üreme görüldü ve tüplere yerleştirilip inkübasyon süresi boyunca her gün değiştirilen kurşun asetatlı kağıtlarda hiç bir siyahlaşma görülmedi. Kontrol olarak ekimi yapılan *B. abortus* 544 biyotip 1 suşu sadece CO<sub>2</sub> varlığında üreyip kurşun asetatlı kağıtta önemli ölçüde bir siyahlaşma gösterirken, *B. melitensis* 16M biyotip 1 suşu hem aerob ve hem de %5-10 CO<sub>2</sub> 'li ortamlarda üreyip kurşun asetatlı kağıtta hiçbir siyahlaşma göstermedi.

Sonuçta, izolatların üreme için CO<sub>2</sub>'e gereksinim göstermediği ve H<sub>2</sub>S üretmediği saptandı.

**3.2** Tiyonin ve bazik fuksin varlığında üreme: Çikolata agar besiyerinden alınan 4-5 koloni; içersinde %15 gliserin ilaveli TSB bulunan 1 ml'lik cryovial tüplerde çözdürüldü. Her bir bakteri suşu ve kontrol suşları için hazırlanan cryovial tüpten bir öze dolusu süspansiyon alınıp direkt tiyonin ve bazik fuksinin 1/50.000 konsantrasyonunu içeren SDA'lara agar yüzeyine birbirine paralel olarak beş şerit halinde ekim yapıldı. Petriler kurduktan sonra %5-10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda, 37°C'de 4 gün inkübe edildiler (23,56).

Testte kontrol olarak tiyoninli ve bazik fuksinli SDA petrilerden herbirine *B. melitensis* Rev1, *B. melitensis* 16M (biyotip 1), *B. abortus* 544 (biyotip 1), *B. abortus* 86/8/59 (biyotip 2) ve *B. suis* 1330 (biyotip 1) referans suşlarının ekimi yapıldı. Bu suşlar boyalı besiyerlerine kontrol olarak ekilen kendine özgü reaksiyonu olan suşlardır (19,23,48,56,70). Sonuçlar, inkübasyon periyodunun sonunda üreme durumlarına göre değerlendirildi.

Test edilecek tüm izolatlarının tiyonin ve bazik fuksin varlığında ürediği gözlemlendi. İzolatlarımızın tümü Tbilisi fajının RTD ve 10.000xRTD'unda lizis göstermediler.

Kontrol suşların tiyoninli besiyerine olan ekimlerinde *B. melitensis* Rev1, *B. abortus* 544 ve *B. abortus* 86/8/59 üreme göstermedi. Üreme gösteren *B. melitensis* 16M ve *B. suis* 1330 kontrol suşları Tbilisi fajı ile lize olmadılar (56).

Bazik fuksinli besiyerinde *B. melitensis* Rev 1, *B. abortus* 86/8/59 ve *B. suis* 1330 kontrol suşları üreme göstermediler. Üreme gösteren *B. melitensis* 16M Tbilisi fajı ile lize olmazken *B. abortus* 544 Tbilisi fajı ile lizis gösterdi.

**3.3 Safranin O içeren besiyerinde üreme:** SDA'a 100 µg/ml (1/10.000) konsantrasyonunda katılarak hazırlanan safranin O'lu besiyerinde *B. suis* ve *B. abortus* biyotip 2 suşları üreyememektedirler. Bu amaçla, diğer boyalı besiyerlerine ekimlerde belirtilen yöntemle tüm test izolatlarının safranin O'lu besiyerine ekimleri yapıldı ve 4 günlük inkübasyon sonrasında sonuçlar, izolatların üreme durumlarına göre değerlendirildi. Testte kontrol olarak safranin O'lu besiyerinde üremeyen *B. suis* 1330 ve *B. abortus* 86/8/59 suşları kullanıldı (56).

Safranin O'nun 1/ 10000 konsantrasyonunu içeren besiyerinde 4 günlük inkübasyon süresinin ardından izolatların tümünün ürediği gözlemlendi.

Testte negatif kontrol olarak kullanılan *B. abortus* 86/8/59 ve *B. suis* 1330 referans suşları bu besiyerinde üreme göstermediler.

**3.4 A ve M monospesifik anti-serumlar ile aglütinasyon:** Testi yapılacak her bir izolatın bir öze dolusu yoğun kültürü 0.25ml fizyolojik tuzlu su içinde süspansiyon edildi. Bir lam üzerine A ve M monospesifik anti-serumlardan birer damla konuldu ve üzerlerine yine birer damla incelenecek izolatın süspansiyonundan eklenerek ağaç bir kürdanla karıştırıldı. Reaksiyon sonuçları bir dakika içinde oluşan aglütinasyon durumuna göre okunarak kaydedildi (23,56). Testte kontrol olarak, sadece M anti-serumu ile aglütine olan *B. melitensis* 16M (biyotip 1), sadece A anti-serumu ile aglütine olan *B. melitensis* 63/9 (biyotip 2), her iki anti-serumla aglütine olan *B. melitensis* Ether (biyotip 3) ve her iki anti-serumla aglütine olmayan *B. ovis* 63/ 290 referans suşları kullanıldı (19,48,56).

Monospesifik serumlar homolog kültürleri ile karşılaştırıldığında bir dakika içinde belirgin bir aglütinasyon verdiler. Test izolatlarından 42 adedi hem A hem de M anti-serumu

ile aglutinasyon verirken, izolatların 1 adedi ( 33. izolat) sadece M anti-serumu ile aglutinasyon gösterdi.

Kontrol olarak kullanılan *B. melitensis* 16M sadece M anti-serumu ile aglutine olurken, *B. melitensis* 63/9 sadece A anti-serumu ile ve *B. melitensis* Ether suşu ise her iki anti-serumla aglutinasyon verdiler. *B. ovis* gerek A ve gerekse de M anti-serumu ile aglutinasyon göstermedi.

Tüm bu testler sonucunda antibiyotik duyarlılık testlerimizi yaparken kullanacağımız 53 izolatımızın; 2003 (16'sı kan kültüründen, biri eklem sıvısından izole edilen toplam 17 suş )-2004 (25'i kan kültüründen biri eklem sıvısından izole edilen toplam 26 suş) yıllarına ait ve 41'i kan kültürü ikisi eklem sıvısından izole edilmiş toplam 43'ünün *Brucella* genusundan olduğu, bunlarında 42'sinin *B. melitensis* biyotip 3, 1'nin ise *B. melitensis* biyotip 1 olduğu saptandı. Eklem sıvısından izole edilen her 2 suşun da *B. melitensis* biyotip 3 olduğu belirlendi ( Tablo 7).

**Tablo 7: *Brucella* kontrol suşlarının ve test izolatlarının tür ve biyotiplendirme testlerinde gösterdikleri reaksiyonlar**

Stand.suş ve izolat no	CO <sub>2</sub> iht.	H <sub>2</sub> S üret.	Baz. fuk.ve tiyon. üreme		A ve M mono-sps anti-ser. aglutinas.		Tbilisi faj lizis		Safranin. O'da üreme
			BF	T	A	M	RTD	RTDx10 <sup>4</sup>	
<i>B. abortus</i> 544	+	+	+	-			+		
<i>B. abortus</i> 86/8/59			-	-					-
<i>B. meliten.</i> 16M	-	-	+	+	-	+	-	-	
<i>B. meliten.</i> 63/9					+	-			
<i>B. meliten.</i> Ether					+	+			
<i>B.suis</i> 1330			-	+			-		-
<i>B. meliten.</i> Rev.1			-	-					
<i>B. ovis</i> 63/290					-	-			
1	-	-	+	+	+	+	-	-	+
2	-	-	+	+	+	+	-	-	+
3	-	-	+	+	+	+	-	-	+
4	-	-	+	+	+	+	-	-	+
5	-	-	+	+	+	+	-	-	+
6	-	-	+	+	+	+	-	-	+
7	-	-	+	+	+	+	-	-	+
8	-	-	+	+	-	+	-	-	+

9	-	-	+	+	+	+	-	-	+
10	-	-	+	+	+	+	-	-	+
11	-	-	-	-	+	+	-	-	+
12	-	-	+	+	+	+	-	-	+
13	-	-	+	+	+	+	-	-	+
14	-	-	+	+	+	+	-	-	+
15	-	-	-	-	+	+	-	-	+
16	-	-	+	+	+	+	-	-	+
17	-	-	+	+	+	+	-	-	+
18	-	-	+	+	+	+	-	-	+
19	-	-	+	+	-	+	-	-	+
20	-	-	+	+	+	+	-	-	+
21	-	-	+	+	+	+	-	-	+
22	-	-	+	+	+	+	-	-	+
23	-	-	+	+	+	+	-	-	+
24	-	-	+	+	+	+	-	-	+
25	-	-	+	+	+	+	-	-	+
26	-	-	+	+	+	+	-	-	+
27	-	-	+	+	+	+	-	-	+
28	-	-	+	+	+	+	-	-	+
29	-	-	+	+	+	+	-	-	+
30	-	-	+	+	+	+	-	-	+
31	-	-	+	+	+	+	-	-	+
32	-	-	+	+	+	+	-	-	+
33	-	-	+	+	-	+	-	-	+
34	-	-	+	+	+	+	-	-	+
35	-	-	+	+	+	+	-	-	+
36	-	-	+	+	+	+	-	-	+
37	-	-	+	+	+	+	-	-	+
38	-	-	+	+	+	+	-	-	+
39	-	-	+	+	+	+	-	-	+
40	-	-	+	+	+	+	-	-	+
41	-	-	+	+	+	+	-	-	+
42	-	-	+	+	+	+	-	-	+
43	-	-	+	+	+	+	-	-	+

## ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

İn vitro duyarlılık testlerine göre streptomisin, rifampisin, siprofloksasin ve doksisiklin *Brucella* cinsi bakterilere karşı etkili antibiyotiklerdir (83,85,86,90,91).

Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin (ESCMID) Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu için oluşturduğu komite (EUCAST), hücre içi patojenlerin antibiyotik duyarlılığının test edilmesinde kullanılacak yöntemleri içeren 'Eucast Discussion Document E.Dis 6.1' isimli bir kılavuz hazırlamıştır (92). Bu kılavuzda *Brucella* cinsi üyelerinin antibiyotik duyarlılığının çalışılması için iki yöntem önerilmektedir; agar dilüsyon ve broth dilüsyon yöntemleri (92,93). Bu kılavuzda, Garcia-

Rodriguez ve arkadaşlarının çalışmasında kullanıldığı *Haemophilus influenzae* duyarlılık testlerinde kullanılan agar dilüsyon metodu ile *Brucella* cinsi bakterilerin minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) saptanması önerilmektedir (90,93-95).

### **Agar Dilüsyon Yöntemi**

Agar dilüsyon yöntemi, bir ya da birden fazla bakteri izolatının antibiyotiklere karşı MİK değerlerini saptamak için kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Yoğun emek gerektiren bir test olduğu için az sayıda bakteri için uygulanması pratik değildir. Fazla sayıdaki bakterinin çalışılması açısından güvenilir ve pratik bir yöntemdir. Bu yöntemde, antibiyotik dilüsyonları eritilmiş ve 48-50°C'ye getirilmiş sıvı agar ile karıştırılıp petrilere dökülür. Antibiyotikli bu agarın donmasından sonra bakterilerin inoküle edilip 24-48 saatlik inkübasyonlarından sonra üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon kantitatif olarak ( $\mu\text{g/ml}$ ) saptanır (96,97).

*Brucella* cinsi bakterileri için tecih edilen besiyeri, %1 hemoglobün ve 1% PoliViteX ilave edilmiş Mueller-Hinton agar (MHA) olabilir. İnokulumda bakteri sayısı  $10^4$  CFU olmalıdır. İnkübyasyon süresi %5 CO<sup>2</sup>'li ortamda 37°C'de 48 saat süredir (90).

Agar dilüsyon yöntemi; Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI)'in genel önerileri doğrultusunda, EUCAST'ın hazırladığı intraselüler patojenlerin antibiyotik duyarlılığının test edilmesinde kullanılacak yöntemleri içeren klavuzunda yer alan makaledeki Garcia-Rodriguez ve ark.'nın çalışmasında kullanılan yöntemle belirlendi (90,92,93,98).

Testin yapılışı:

1. Deneyde kullanılan antimikrobiyal maddeler: Doksisisiklin (Doxycycline hyclate D-9891 Sigma Chemical Co. USA), rifampin (Rifamycin SV sodium salt R-8626 Sigma Chemical Co. USA), streptomisin (Streptomycin sulfate salt S-6501 Sigma Chemical Co. USA), siprofloksasin (Ciprofloxacin HCL aktif maddesi Bayer Türk Kimya San. Tic. Ltd. Sti.) antibiyotik potensleri belirtilmiş olarak temin edildi. Aktif maddelerin antibiyotik potensleri, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 kullanılarak kontrol edildi (8,94,96,99,100).

2. Antimikrobiyal maddelerin stok çözeltilerinin hazırlanması (101): Antimikrobiyal maddeler aşağıdaki formüllere göre tartılarak hazırlanmıştır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon (}\mu\text{g)}}{\text{Antibiyotik potensi}} \quad \text{Hacim} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Antibiyotik potensi}}{\text{Antibiyotik potensi}}$$

Yukarıdaki formüllere göre gerekli ölçümler yapılarak siprofloksasin, streptomisin doksisisiklin ve rifampin için 160 µg/ml olacak şekilde antibiyotik stok solüsyonları hazırlandı. Antibiyotikler önce Tablo 8’de gösterilen uygun çözücülerde eritildi. Ardından sulandırıcı ile gerekli hacime tamamlandı (101).

Her bir antimikrobiyal madde için stok çözelti hazırlamada kullanılan eritici ve seyreltme sıvıları Tablo 8’de görülmektedir.

**Tablo 8: Antimikrobiyal maddeler için eritici ve seyreltme sıvıları (101)**

Antimikrobiyalın adı	Çözücü	Sulandırıcı
Siprofloksasin	Steril distile su	Steril distile su
Doksisisiklin	Steril distile su	Steril distile su
Streptomisin	Steril distile su	Steril distile su
Rifampin	Metanol	Steril distile su

Siprofloksasin, streptomisin, doksisisiklin ve rifampin için 11’er adet steril tüp alınarak ikinci tüpten itibaren hepsine 5ml %1 PoliViteX ilaveli MHB konuldu. Her bir antibiyotik için ilk tüpe 160 µg/ml’lik stok solüsyonundan 5 ml konuldu. İkinci tüpe de 5ml konularak birkaç kez karıştırıldı. İkinci tüpten itibaren 5 ml alınarak son tüpe kadar titrasyon uygulandı. Son tüpten alınan 5 ml dışarı atıldı. İlk tüpteki 160 µg/ml olan antibiyotik konsantrasyonu son tüpte 0.15 µg/ml’ye indi.

3. Ekim ve değerlendirme: Deneyde %5 defibrine koyun kanı ve %1 PoliViteX ilaveli MHA kullanıldı. Hazırlanan besiyeri 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra besiyeri pH’sı kontrol edildi ve yaklaşık 7.2 olduğu görüldü. Besiyeri 50°C’ye kadar soğutulduğunda koyun kanı ve PoliViteX ilave edildi. Her antibiyotik için 1’den 11’e kadar numaralandırılan steril petrilere 18 ml koyun kanı ve PoliViteX ilaveli MHA ve 2 ml antibiyotik solüsyonu dökülerek karıştırıldı. Böylece antibiyotikler on kez seyreltilerek her bir antibiyotik için ilk petride 16 µg/ml’lik, son petride 0.015 µg/ml’lik antibiyotik konsantrasyonuna ulaşıldı.

Her test için antibiyotik içermeyen kontrol besiyerleri hazırlandı. Kökenlerin kontrolü için antibiyotik içermeyen besiyerlerine ekimler yapıldı. Antibiyotik içeren besiyerlerinin

kontrolü için ise *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 29213 kökenleri kontrol olarak kullanıldı.

4. İnokulum hazırlanması: Skim-milk besiyerinde  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış olan bakteriler, çikolata agara iki kez pasajlanarak saf kolonileri elde edildi. Besiyerlerinin 48 saat inkübe edilmesinden sonra kültürden 4-5 koloni alınıp %1 PoliViteX ilaveli MHB'a ekildi.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 48 saat inkübe edildi. Daha sonra tüp bulanıklılığı  $10^8$  CFU/ml'ye eşdeğer bulanıklığa sahip McFarland 0.5 standart bulanıklığına göre ayarlandı. Steril U dipli mikropleytlar kullanılarak 20 µl bakteri süspansiyonundan 180 µl PoliViteX ilaveli MHB konuldu. Böylece inokulum süspansiyonunun  $10^7$  CFU/ml olması sağlandı. Bakteriler kırksekiz uçlu inokülatör ile mikropleyitten alınıp önce kontrol, sonra en düşük konsantrasyonlu MHA plağından başlayarak sırasıyla agar yüzeyine inoküle edildi. Böylece antibiyotik içeren besiyerlerine her kökenin süspansiyonundan 1 µl ekilerek son inokulum,  $10^4$  CFU/ml'ye düşürüldü (8,90,99,101).

Makroskopik üremenin gözlenmediği en düşük antibiyotik dilüsyonu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), kökenlerin %50'sinin üremesini önleyen MİK değeri MİK<sub>50</sub>, %90'ının üremesini önleyen MİK değeri MİK<sub>90</sub> olarak kabul edildi (8,90,99).

### **E Test Yöntemi**

E Test, anaerob ve nazlı bakteriler dahil geniş bir spektrumun in vitro antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılmasına olanak sağlayan bir testtir. E Test disk difüzyon ile agar dilüsyon prensiplerini birleştirmektedir. Disk difüzyon gibi kolay olup dilüsyon testleri gibi MİK değerinin saptanmasını sağlamaktadır (99,102). E Test değerlendirme kriterleri aerob mikroorganizmalar için CLSI M7-A7 dökümanına göre yapılmaktadır. Nazlı bakteriler için modifikasyonlar gereklidir (99,101).

Bu yöntemde; E Test stripleri inokulumla kaplı agar plak üzerine yerleştirilir. Antimikrobiyal madde agara difüzyonla yayılır ve strip boyunca devam eden antibiyotik konsantrasyon gradienti oluşturur. İnkübasyon sonrası eliptik bir inhibisyon zonu oluşur. MİK değeri inhibisyon zonunun E Test stribini kestiği noktanın bir üst değeridir (99,102).

*Brucella* cinsi bakterileri için tercih edilen besiyeri, %1 hemoglobin ve %1 PoliViteX ilave edilmiş MHA olabilir (90). İnokulum da bakteri sayısı  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml olmalıdır. İnkübasyon süresi %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 48-72 saat süredir (96,99).



E Test yöntemi; Orhan ve ark.'nın (12), Gür ve ark.'nın (9), Eşel ve ark.'nın (8), Turkmani ve ark.'nın (10) ve de Turan ve ark.'nın (103) çalışmalarını anlatan makaleler referans alınarak belirlendi.

Testin yapılışı:

Skim-milk besiyerinde  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış olan bakteriler, çikolata agara iki kez pasajlanarak saf kolonileri elde edildi. Her bir izolat için dört farklı antibiyotik sribi kullanılacağından ve bu stripler 100 mm'lik plaklara ikişerli şekilde yerleştirileceğinden her bir izolat ve kontrol suşları için %5 koyun kanı ve %1 PoliViteX ilave edilmiş ikişer adet MHA plak hazırlandı. Plaklar kullanılmadan önce kapakları hafif açılarak nemli kalması engellendi (96,99).

1. İnokulumun hazırlanması: Çikolata agardaki 48 saatlik kültürden 4-5 koloni alınıp %1 PoliViteX ilaveli MHB' a ekildi.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 48-72 saat inkübe edildi. Daha sonra tüp bulanıklılığı McFarland 0.5 standart bulanıklığına göre ayarlandı. Son inokulum  $10^4$  CFU/ml olacak şekilde her bir izolat için hazırlanan inokulum; %5 koyun kanı ve %1 PoliViteX ilave edilmiş MHA plakları yüzeyine tüpün cidarına rotasyon yaptırarak fazla sıvısı uzaklaştırılmış steril bir svapla plak her seferde  $60^{\circ}$  döndürülerek üç sefer sürtüldü. E Test stripleri yerleştirilmeden önce plaklar tekrar kurumaları için 10 dakika bekletildi (96,99).

2. E Test striplerinin yerleştirilmesi: İnokulum ekilmiş 100 mm çapındaki MHA plaklarının yüzeyi tamamen kuruduktan sonra E Test stripleri ikişerli olarak birbirine paralel fakat zıt yönde yerleştirildi.

3. İnkübasyon: E Test stripleri yerleştirilen plaklar en geç 15 dakika içinde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 48 ve 72 saat inkübe edildi.

4. Sonuçların yorumlanması: İnhibisyon zonunun E Test sribine temas ettiği değer bir üst değeri o izolat için MİK değeri olarak yorumlandı (9,10,12,96,99,102,103). Değerler 48 ve 72. saatte olmak üzere iki kez okundu. Sonuçların değerlendirilmesinde CLSI M100-S17 ve M7-A7 dökümanlarındaki MİK değerleri kullanılarak duyarlı, orta derece duyarlı ve dirençli olarak belirtildi (96,99-101). E Test sonuçları agar dilüsyon metodunda kullanılan iki kat dilüsyon değerlerine göre rapor edileceğinden E Test MİK değeri bir üst iki kat dilüsyon değerine yuvarlandı (8,96,99).

E Test yöntemi iki kez tekrarlandı.

## KULLANILAN İSTATİSTİKİ YÖNTEM

Kırküş *Brucella* kökeni üzerinde hem agar dilüsyon hem E Test ile her bir antibiyotik için ayrı ayrı MİK değerleri saptanacaktır. Her bir antibiyotik ve test için ölçülen değerlerin ortalamasının, standart sapmasının ve %95 güven aralığının hesaplanması planlanmaktadır.

Veriler incelendi, normal dağılıma uyup uymadıkları araştırıldı ve normal dağılıma uymadıkları belirlendi ( $p>0.05$ ). Bu nedenle istatistiksel analiz olarak nonparametrik ölçüm değerleri için bağımlı gruplarda kullanılan bir test olan Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi uygulandı. Verilerin serolojik sınıflamalarına göre aralarındaki uyum korelasyon analizi yapılarak belirlendi. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık değeri  $<0.05$  olarak belirlendi.

Ayrıca agar dilüsyon sonuçlarına göre E Test sonuçlarının uyum yüzdeleri hesaplandı.

## BULGULAR

Çalışmaya 53 izolat alındı. İzole edilen suşların 43 tanesinin *Brucella* genusuna ait olduğu, bunların da 42'sinin *B. melitensis* biyotip 3, 1'inin ise *B. melitensis* biyotip 1 olduğu saptandı. Eklem sıvısından izole edilen iki suşun da *B. melitensis* biyotip 3 olduğu belirlendi.

Kullandığımız standart kökenlerin MİK değerleri tüm antibiyotiklerde CLSI duyarlılık sınır değerleri arasında bulundu ( Tablo 9) (100).

**Tablo 9: Standart kökenlerinin MİK değerleri**

MİK(µg/ml)		
Antimikrobiyaller	Stand. Suşlar	PH 7
Doksisiklin	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.25
Streptomisin	<i>E. coli</i> ATCC 25922	8
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8
Siprofloksasin	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.015
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.25
Rifampin	<i>E. coli</i> ATCC 25922	16
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.015

Ayrıca *B. melitensis* M16 ve *B. melitensis* Ether kökenlerinin MİK değerleri saptandı (Tablo 10).

**Tablo 10: Standart *Brucella* kökenlerinin MİK değerleri.**

MİK(µg/ml)		
Antimikrobiyaller	Stand. Suşlar	PH 7
Doksisiklin	<i>B.melitensis</i> M16	0.125
	<i>B.melitensis</i> Ether	0.125
Streptomisin	<i>B.melitensis</i> M16	2
	<i>B.melitensis</i> Ether	2
Siprofloksasin	<i>B.melitensis</i> M16	0.25
	<i>B.melitensis</i> Ether	0.25
Rifampisin	<i>B.melitensis</i> M16	1
	<i>B.melitensis</i> Ether	1

Bu 43 *Brucella* suşuna karşı doksisiklin, rifampin, siprofloksasin ve streptomisin hem agar dilüsyon hem de E Test yöntemi ile 48 saat ve 72 saat inkübasyon sonundaki MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri araştırıldı (Tablo 11-13). Altın standart olarak kabul edilen agar dilüsyon değerleri iki kez tekrarlanan E Test değerleri ile ayrı ayrı karşılaştırıldı ve hem rakamsal ilişkilerine hem de antibiyotik duyarlılığı (Tablo 14-21) açısından uyumlu olup olmadıklarına bakıldı (Tablo 22-25). Veriler istatistiksel açıdan da değerlendirildi (Tablo 26-29). Bunun yanında her iki E Testin birbiriyle uyumlu olup olmadığı ve yine her bir testin 48 saat değerleri ile 72 saat değerleri kendi içinde değerlendirildi.

**Tablo 11: Agar dilüsyon ile elde edilen MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerleri ve MİK aralıkları**

Antimikrobiyal	Range	48 saat		72 saat		
		MİK50	MİK90	Range	MİK50	MİK90
Doksisiklin	0.03 - 0.125	0.125	0.125	0.06 – 0.25	0.25	0.25
Streptomisin	2 - 4	2	2	2-4	4	4
Siprofloksasin	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5
Rifampin	0.5 – 2	1	2	1 – 2	2	2

**Tablo 12: E Test-1 ile elde edilen MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerleri ve MİK aralıkları**

Antimikrobiyal	48 saat			72 saat		
	Range	MİK50	MİK90	Range	MİK50	MİK90
Doksisiklin	0.03 - 0.125	0.06	0.125	0.06 - 0.125	0.125	0.125
Streptomisin	1 - 16	2	2	2 - 16	2	2
Siprofloksasin	0.125 - 0.5	0.25	0.5	0.25 - 0.5	0.25	0.5
Rifampin	0.5 - 1	1	1	0.5 - 1	1	1

**Tablo 13: E Test-2 ile elde edilen MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerleri ve MİK aralıkları**

Antimikrobiyal	48 saat			72 saat		
	Range	MİK50	MİK90	Range	MİK50	MİK90
Doksisiklin	0.03 - 0.125	0.06	0.125	0.03 - 0.125	0.125	0.125
Streptomisin	1 - 16	2	2	2 - 16	2	4
Siprofloksasin	0.125 - 0.5	0.25	0.5	0.25 - 0.5	0.5	0.5
Rifampin	0.5 - 1	1	1	0.5 - 2	1	1

**Tablo 14: Doksisisiklin için agar dilüsyon ve E Test-1 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları.**

KÖKENLER	AGAR DİLÜSYON				E TEST-1			
	48 saat		72 saat		48 saat		72 saat	
1	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.125	S
2	0.06	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
3	0.03	S	0.06	S	0.06	S	0.06	S
4	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
5	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
6	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
7	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
8	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
9	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
10	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
11	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
12	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
13	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
14	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
15	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
16	0.03	S	0.06	S	0.06	S	0.06	S
17	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
18	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
19	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
20	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
21	0.06	S	0.125	S	0.03	S	0.06	S
22	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
23	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
24	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
25	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
26	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
27	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
28	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
29	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
30	0.06	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
31	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
32	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
33	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
34	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
35	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
36	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
37	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
38	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
39	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
40	0.03	S	0.06	S	0.03	S	0.06	S
41	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
42	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
43	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
16 M	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
Ether	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
Staf	0.25	S	0.5	S	0.125	S	0.25	S
E. coli	1	S	1	S	1	S	1	S

**Tablo 15: Doksisisiklin için agar dilüsyon ve E Test-2 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları.**

KÖKENLER	AGAR DİLÜSYON				E TEST-2			
	48 saat		72 saat		48 saat		72 saat	
1	0.06	S	0.125	S	0.125	S	0.125	S
2	0.06	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
3	0.03	S	0.06	S	0.06	S	0.06	S
4	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
5	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
6	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
7	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
8	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
9	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
10	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
11	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
12	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
13	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
14	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
15	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
16	0.03	S	0.06	S	0.06	S	0.06	S
17	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
18	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
19	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
20	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
21	0.06	S	0.125	S	0.03	S	0.06	S
22	0.06	S	0.125	S	0.03	S	0.03	S
23	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
24	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
25	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
26	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
27	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
28	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
29	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
30	0.06	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
31	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
32	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.125	S
33	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
34	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
35	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.06	S
36	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
37	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
38	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
39	0.06	S	0.125	S	0.06	S	0.06	S
40	0.03	S	0.06	S	0.03	S	0.06	S
41	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
42	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
43	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
16 M	0.125	S	0.25	S	0.06	S	0.125	S
Ether	0.125	S	0.25	S	0.125	S	0.125	S
Staf	0.25	S	0.5	S	0.125	S	0.25	S
E. coli	1	S	1	S	1	S	1	S

**Tablo 16: Streptomisin için agar dilüsyon ve E Test-1 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları.**

KÖKENLER	AGAR DİLÜSYON				E TEST-1			
	48 saat		72 saat		48 saat		72 saat	
1	2	S	2	S	2	S	2	S
2	2	S	2	S	2	S	2	S
3	2	S	2	S	2	S	2	S
4	4	S	4	S	2	S	2	S
5	2	S	2	S	2	S	2	S
6	2	S	2	S	2	S	2	S
7	2	S	2	S	4	S	4	S
8	4	S	4	S	2	S	2	S
9	2	S	4	S	2	S	2	S
10	2	S	4	S	2	S	2	S
11	2	S	4	S	2	S	2	S
12	2	S	4	S	2	S	2	S
13	2	S	4	S	2	S	2	S
14	2	S	4	S	2	S	2	S
15	2	S	4	S	2	S	2	S
16	2	S	2	S	2	S	2	S
17	4	S	4	S	2	S	2	S
18	2	S	4	S	2	S	2	S
19	2	S	4	S	2	S	2	S
20	2	S	4	S	2	S	2	S
21	2	S	2	S	16	S	16	S
22	2	S	4	S	2	S	2	S
23	2	S	4	S	4	S	4	S
24	2	S	4	S	2	S	2	S
25	2	S	4	S	2	S	2	S
26	2	S	4	S	2	S	2	S
27	2	S	4	S	2	S	2	S
28	2	S	4	S	2	S	2	S
29	2	S	4	S	2	S	2	S
30	2	S	4	S	2	S	2	S
31	2	S	4	S	2	S	2	S
32	2	S	2	S	2	S	2	S
33	2	S	4	S	2	S	2	S
34	2	S	4	S	2	S	2	S
35	2	S	4	S	2	S	2	S
36	2	S	4	S	2	S	2	S
37	2	S	4	S	2	S	2	S
38	2	S	4	S	2	S	2	S
39	2	S	4	S	2	S	2	S
40	2	S	2	S	2	S	2	S
41	2	S	4	S	2	S	2	S
42	2	S	4	S	1	S	2	S
43	2	S	4	S	1	S	2	S
16 M	2	S	4	S	2	S	2	S
Ether	2	S	4	S	1	S	1	S
Staf	8	S	8	S	8	S	8	S
E. coli	8	S	8	S	16	S	16	S



**Tablo 17: Streptomisin için agar dilüsyon ve E Test-2 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları.**

KÖKENLER	AGAR DİLÜSYON				E TEST-2			
	48 saat		72 saat		48 saat		72 saat	
1	2	S	2	S	2	S	2	S
2	2	S	2	S	4	S	4	S
3	2	S	2	S	4	S	4	S
4	4	S	4	S	2	S	2	S
5	2	S	2	S	2	S	2	S
6	2	S	2	S	2	S	2	S
7	2	S	2	S	2	S	2	S
8	4	S	4	S	2	S	2	S
9	2	S	4	S	2	S	2	S
10	2	S	4	S	2	S	2	S
11	2	S	4	S	2	S	2	S
12	2	S	4	S	2	S	2	S
13	2	S	4	S	2	S	2	S
14	2	S	4	S	4	S	4	S
15	2	S	4	S	2	S	2	S
16	2	S	2	S	2	S	2	S
17	4	S	4	S	2	S	2	S
18	2	S	4	S	2	S	4	S
19	2	S	4	S	2	S	2	S
20	2	S	4	S	2	S	2	S
21	2	S	2	S	16	S	16	S
22	2	S	4	S	2	S	4	S
23	2	S	4	S	2	S	2	S
24	2	S	4	S	2	S	4	S
25	2	S	4	S	2	S	4	S
26	2	S	4	S	2	S	2	S
27	2	S	4	S	2	S	4	S
28	2	S	4	S	2	S	2	S
29	2	S	4	S	2	S	4	S
30	2	S	4	S	2	S	4	S
31	2	S	4	S	2	S	2	S
32	2	S	2	S	2	S	2	S
33	2	S	4	S	2	S	2	S
34	2	S	4	S	2	S	2	S
35	2	S	4	S	2	S	2	S
36	2	S	4	S	2	S	2	S
37	2	S	4	S	2	S	2	S
38	2	S	4	S	2	S	2	S
39	2	S	4	S	1	S	2	S
40	2	S	2	S	2	S	2	S
41	2	S	4	S	1	S	2	S
42	2	S	4	S	2	S	2	S
43	2	S	4	S	1	S	2	S
16 M	2	S	4	S	2	S	4	S
Ether	2	S	4	S	0.5	S	1	S
Staf	8	S	8	S	8	S	8	S
E. coli	8	S	8	S	16	S	16	S

**Tablo 18: Siprofloksasin için agar dilüsyon ve E Test-1 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları.**

KÖKENLER	AGAR DİLÜSYON				E TEST-1			
	48 saat		72 saat		48 saat		72 saat	
1	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
2	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
3	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
4	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
5	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
6	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
7	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
8	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
9	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
10	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
11	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
12	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
13	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
14	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
15	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
16	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
17	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
18	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
19	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
20	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
21	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
22	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
23	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
24	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
25	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
26	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
27	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
28	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
29	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
30	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
31	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
32	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
33	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
34	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
35	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
36	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
37	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
38	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
39	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
40	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
41	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
42	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
43	0.25	S	0.5	S	0.125	S	0.25	S
16 M	0.25	S	0.5	S	0.125	S	0.125	S
Ether	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.5	S
Staf	0.25	S	0.25	S	0.25	S	0.25	S
E. coli	0.015	S	0.015	S	0.015	S	0.015	S

**Tablo 19: Siprofloksasin için agar dilüsyon ve E Test-2 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları.**

KÖKENLER	AGAR DİLÜSYON				E TEST-2			
	48 saat		72 saat		48 saat		72 saat	
1	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
2	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
3	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
4	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
5	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
6	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
7	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.5	S
8	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
9	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
10	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.5	S
11	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.5	S
12	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
13	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
14	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
15	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.5	S
16	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
17	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.5	S
18	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
19	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
20	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
21	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
22	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
23	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
24	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
25	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
26	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
27	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
28	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
29	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
30	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
31	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
32	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
33	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
34	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
35	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
36	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
37	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
38	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
39	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
40	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
41	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
42	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
43	0.25	S	0.5	S	0.125	S	0.25	S
16 M	0.25	S	0.5	S	0.125	S	0.125	S
Ether	0.25	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S
Staf	0.25	S	0.25	S	0.25	S	0.25	S
E. coli	0.015	S	0.015	S	0.015	S	0.015	S

**Tablo 20: Rifampisin için agar dilüsyon ve E Test-1 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları.**

KÖKENLER	AGAR DİLÜSYON		E TEST-1	
	48 saat	72 saat	48 saat	72 saat
1	0.5 S	1 S	0.5 S	1 S
2	1 S	2 I	1 S	1 S
3	2 I	2 I	1 S	1 S
4	2 I	2 I	1 S	1 S
5	2 I	2 I	1 S	1 S
6	2 I	2 I	1 S	1 S
7	0.5 S	2 I	1 S	1 S
8	0.5 S	2 I	1 S	1 S
9	1 S	1 S	1 S	1 S
10	1 S	2 I	1 S	1 S
11	0.5 S	2 I	1 S	1 S
12	0.5 S	2 I	1 S	1 S
13	0.5 S	2 I	0.5 S	0.5 S
14	0.5 S	2 I	1 S	1 S
15	1 S	2 I	1 S	1 S
16	1 S	2 I	1 S	1 S
17	2 I	2 I	1 S	1 S
18	1 S	2 I	1 S	1 S
19	2 I	2 I	1 S	1 S
20	0.5 S	2 I	1 S	1 S
21	0.5 S	2 I	1 S	1 S
22	0.5 S	2 I	1 S	1 S
23	0.5 S	2 I	1 S	1 S
24	0.5 S	2 I	1 S	1 S
25	0.5 S	2 I	1 S	1 S
26	0.5 S	2 I	1 S	1 S
27	0.5 S	2 I	1 S	1 S
28	0.5 S	2 I	1 S	1 S
29	0.5 S	2 I	1 S	1 S
30	0.5 S	2 I	1 S	1 S
31	2 I	2 I	0.5 S	0.5 S
32	1 S	2 I	1 S	1 S
33	1 S	2 I	1 S	1 S
34	1 S	2 I	1 S	1 S
35	1 S	2 I	1 S	1 S
36	1 S	2 I	1 S	1 S
37	1 S	2 I	1 S	1 S
38	1 S	2 I	1 S	1 S
39	0.5 S	2 I	1 S	1 S
40	1 S	2 I	1 S	1 S
41	2 I	2 I	1 S	1 S
42	0.5 S	2 I	1 S	1 S
43	0.5 S	2 I	0.5 S	1 S
16 M	0.5 S	2 I	1 S	1 S
Ether	0.5 S	2 I	1 S	1 S
Staf	0.015 S	0.015 S	0.015 S	0.015 S
E. coli	16 S	16 S	16 S	16 S

**Tablo 21: Rifampisin için agar dilüsyon ve E Test-2 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları.**

KÖKENLER	AGAR DİLÜSYON				E TEST-2			
	48 saat		72 saat		48 saat		72 saat	
1	0.5	S	1	S	1	S	1	S
2	1	S	2	I	1	S	1	S
3	2	I	2	I	1	S	1	S
4	2	I	2	I	1	S	1	S
5	2	I	2	I	1	S	1	S
6	2	I	2	I	1	S	2	I
7	0.5	S	2	I	1	S	1	S
8	0.5	S	2	I	1	S	1	S
9	1	S	1	S	1	S	1	S
10	1	S	2	I	1	S	1	S
11	0.5	S	2	I	1	S	2	I
12	0.5	S	2	I	1	S	1	S
13	0.5	S	2	I	0.5	S	0.5	S
14	0.5	S	2	I	1	S	1	S
15	1	S	2	I	1	S	1	S
16	1	S	2	I	1	S	1	S
17	2	I	2	I	1	S	1	S
18	1	S	2	I	1	S	1	S
19	2	I	2	I	1	S	1	S
20	0.5	S	2	I	1	S	1	S
21	0.5	S	2	I	1	S	1	S
22	0.5	S	2	I	1	S	1	S
23	0.5	S	2	I	1	S	1	S
24	0.5	S	2	I	1	S	2	I
25	0.5	S	2	I	1	S	1	S
26	0.5	S	2	I	1	S	1	S
27	0.5	S	2	I	1	S	1	S
28	0.5	S	2	I	1	S	1	S
29	0.5	S	2	I	1	S	1	S
30	0.5	S	2	I	1	S	1	S
31	2	I	2	I	1	S	1	S
32	1	S	2	I	1	S	2	I
33	1	S	2	I	1	S	1	S
34	1	S	2	I	1	S	1	S
35	1	S	2	I	1	S	1	S
36	1	S	2	I	1	S	1	S
37	1	S	2	I	1	S	1	S
38	1	S	2	I	1	S	1	S
39	0.5	S	2	I	1	S	1	S
40	1	S	2	I	1	S	1	S
41	2	I	2	I	1	S	1	S
42	0.5	S	2	I	1	S	1	S
43	0.5	S	2	I	0.5	S	0.5	S
16 M	0.5	S	2	I	1	S	1	S
Ether	0.5	S	2	I	1	S	1	S
Staf	0.015	S	0.015	S	0.015	S	0.015	S
E. coli	16	S	16	S	16	S	16	S

**Tablo 22: CLSI Kriterlerine Göre Sınır Değerler**

<b>Antimikrobiyal</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Doksisiklin	≤1*	-	-
Streptomisin	≤8*	-	-
Siprofloksasin	≤1	-	-
Rifampin	≤1	2	≥4

(\*:buyyonun CO<sub>2</sub>' deki inkübasyonu MİK' i aminoglikozidlerde genellikle bir dilüsyon yükseltirken tetrasiklinlerde düşürebilir. buyyon CO<sub>2</sub>' de inkübe edildiğinde streptomisine duyarlı sınır değeri ≤16 µ/ ml kabul edilir.)

**Tablo 23: Agar dilüsyon yöntemiyle yorumlama kategorisine giren bakteri sayısı ve yüzdeleri**

<b>Antimikrobiyal</b>	<b>48 saat</b>			<b>72 saat</b>		
	<b>(%)</b>			<b>(%)</b>		
	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Doksisiklin	43(100)	-	-	43(100)	-	-
Streptomisin	43(100)	-	-	43(100)	-	-
Siprofloksasin	43(100)	-	-	43(100)	-	-
Rifampin	35(81)	8(19)	-	2(5)	41(95)	-

**Tablo 24: E Test-1 yöntemiyle yorumlama kategorisine giren bakteri sayısı ve yüzdeleri**

<b>Antimikrobiyal</b>	<b>48 saat</b>			<b>72 saat</b>		
	<b>(%)</b>			<b>(%)</b>		
	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Doksisiklin	43(100)	-	-	43(100)	-	-
Streptomisin	43(100)	-	-	43(100)	-	-
Siprofloksasin	43(100)	-	-	43(100)	-	-
Rifampin	43(100)	-	-	43(100)	-	-

**Tablo 25: E Test-2 yöntemiyle yorumlama kategorisine giren bakteri sayısı ve yüzdeleri**

<b>Antimikrobiyal</b>	<b>48 saat</b>			<b>72 saat</b>		
	<b>(%)</b>			<b>(%)</b>		
	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Doksisiklin	43(100)	-	-	43(100)	-	-
Streptomisin	43(100)	-	-	43(100)	-	-
Siprofloksasin	43(100)	-	-	43(100)	-	-
Rifampin	43(100)	-	-	39(91)	4(9)	-

Veriler incelendi, normal dağılıma uyup uymadıkları araştırıldı ve normal dağılıma uymadıkları belirlendi ( $p>0.05$ ). Bu nedenle istatistiksel analiz olarak non-parametrik ölçüm değerleri için bağımlı gruplarda kullanılan bir test olan Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi uygulandı. Verilerin serolojik sınıflamalarına göre aralarındaki uyum korelasyon analizi yapılarak belirlendi. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık değeri  $<0.05$  olarak belirlendi. Ayrıca agar aglütinasyon sonuçlarına göre E Test sonuçlarının uyum yüzdeleri hesaplandı. Buna göre veriler her bir antibiyotik için ayrı ayrı olacak şekilde tablo halinde sunuldu. Verilerin serolojik sınıflamasına göre ölçüm değerleri Wilcoxon Testi ile analiz edildi (Tablo 26-29).

**Tablo 26: Doksisisiklin için korelasyon analiz sonuçları.**

Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi		
Doksisisiklin		p
Agardilüsyon48	E Test -1 48	$<0.01$
Agardilüsyon48	E Test -2 48	0.01
E Test -1 48	E Test -2 48	<b>0.43</b>
Agardilüsyon72	E Test -1 72	$<0.01$
Agardilüsyon72	E Test -2 72	$<0.01$
E Test -2 72	E Test -2 72	<b>0.52</b>

**Tablo 27: Streptomisin için korelasyon analiz sonuçları.**

Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi		
Streptomisin		p
Agardilüsyon48	E Test -1 48	<b>0.72</b>
Agardilüsyon48	E Test -2 48	<b>0.61</b>
E Test -1 48	E Test -2 48	<b>0.86</b>
Agardilüsyon72	E Test -1 72	$<0.01$
Agardilüsyon72	E Test -2 72	0.01
E Test -2 72	E Test -2 72	0.01

**Tablo 28: Siprofloksasin için korelasyon analiz sonuçları.**

Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi		
Siprofloksasin		p
Agardilüsyon48	E Test -1 48	0.01
Agardilüsyon48	E Test -2 48	$<0.01$
E Test -1 48	E Test -2 48	0.03
Agardilüsyon72	E Test -1 72	$<0.01$
Agardilüsyon72	E Test -2 72	$<0.01$
E Test -2 72	E Test -2 72	0.03

**Tablo 29: Rifampisin için korelasyon analiz sonuçları.**

Wilcoxon İşaretili Sıralar Testi		
Rifampisin		p
Agardilüsyon48	E Test -1 48	<b>0.91</b>
Agardilüsyon48	E Test -2 48	<b>0.98</b>
E Test -1 48	E Test -2 48	<b>0.16</b>
Agardilüsyon72	E Test -1 72	<0.01
Agardilüsyon72	E Test -2 72	<0.01
E Test -2 72	E Test -2 72	<b>0.05</b>

## DOKSİSİKLİN

Çalışmamızda doksisisiklinin agar dilüsyon yöntemi ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 0.03-0.125 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.125 µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 0.06-0.25 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.25 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK değerlerinde bir kat dilüsyon artışı görüldü (Tablo 11).

E Test-1 ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 0.03-0.125 µg/ml, MİK<sub>50</sub> 0.06 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.125 µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 0.06-0.125 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.125 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK<sub>50</sub> değerinde 1 kat dilüsyon artışı gözlemlenirken MİK<sub>90</sub> değerinin değişmediği görüldü (Tablo 12).

E Test-2 ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 0.03-0.125 µg/ml, MİK<sub>50</sub> 0.06 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.125 µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 0.03-0.125 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.125 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK<sub>50</sub> değerinde 1 kat dilüsyon artışı gözlemlenirken diğer MİK değerlerinin değişmediği görüldü (Tablo 13).

Her üç testin doksisisiklin için MİK değerlerine bakıldığında; MİK aralığının aynı olduğu görülürken, agar dilüsyonda MİK<sub>50</sub> değerinin her iki E Test MİK<sub>50</sub> değerinden 1 kat dilüsyon yüksek olduğu görüldü. Her iki E Test'de 72 saat sonunda MİK aralığı, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin aynı olduğu görülürken, agar dilüsyon MİK aralığının her iki E Test'le aynı olduğu, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin 1 kat dilüsyon yüksek olduğu görüldü.

Agar dilüsyon ve E Test MİK değerleri karşılaştırıldığında; agar dilüsyon- E Test-1, agar dilüsyon- E Test-2 ve E Test-1- E Test-2 arasındaki uyum korelasyon analizi tablo 26'da gösterilmiştir. Buna göre doksisisiklinin 48 ve 72 saatlik inkübasyonda MİK değerleri



karşılaştırıldığında agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 arasında değerler açısından ilişki bulunamadı. E Test-1 ve E Test-2 arasında ise değerler açısından ilişki olduğu görüldü.

Yorumlama kategorisine göre değerlendirildiğinde; agar dilüsyon yöntemi ile 43 suşun 48 ve 72 saatlik inkübasyonda doksisisikline duyarlı olduğu tespit edildi (%100). Aynı şekilde her iki E Test yönteminde de 43 suşun 48 ve 72 saatlik inkübasyonda doksisisikline duyarlı olduğu tespit edildi (%100). Doksisisiklin için yorumlama kategorisini istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde agar dilüsyonla E Test arasındaki uyum %100 bulundu.

### **STREPTOMİSİN**

Çalışmamızda streptomisin için agar dilüsyon yöntemi ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 2-4 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 2 µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 2-4 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 4 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK aralığı değerleri değişmezken, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinde 1 kat dilüsyon artışı görüldü (Tablo 11).

E Test-1 ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 1-16 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 2 µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 2-16 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 2 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin değişmediği görüldü (Tablo 12).

E Test-2 ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 1-16 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 2 µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 2-16 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 2 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 4 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK<sub>50</sub> değerinin değişmediği, MİK<sub>90</sub> değerlerinin de ise 1 kat dilüsyon artışı görüldü (Tablo 13).

Her üç testin streptomisin için MİK değerlerine bakıldığında; 48 saat inkübasyonda E Testlerde MİK aralığının, agar dilüsyon yöntemindeki 2-4 µg/ml aralığından 1-16 µg/ml'ye genişlediği, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin aynı olduğu görüldü. E Testlerde MİK aralığının 72 saat sonunda, agar dilüsyon yöntemindeki 2-4 µg/ml aralığından 2-16 µg/ml'ye genişlediği, MİK<sub>50</sub> değerinin agar dilüsyon değerinden 1 kat dilüsyon az olduğu, MİK<sub>90</sub> değerinin ise agar dilüsyon yönteminde 4 µg/ml iken E Test-1 yönteminde bir kat dilüsyon azalmışken E Test-2 yönteminde aynı olduğu saptandı. Sadece bir izolatımızda agar dilüsyon 48 ve 72 saat MİK değerleri 2 µg/ml olarak tespit edilirken aynı izolatımızın her iki E Test yöntemi ile 48 ve 72 saat MİK değerlerini 16 µg/ml (Aslında E Test MİK değerleri her iki saat dilimi için

12µg/ml saptandı. Ancak çalışmamızda E Test yöntemi ile agar dilüsyon yöntemi değerlerini karşılaştırdığımızdan MİK değerini agar dilüsyona denk gelen bir üst ikikat dilüsyona yuvarladık) bulduk (Tablo 16,17). CLSI kriterlerine göre buyyon CO<sub>2</sub>'de inkübe edildiğinde streptomisine duyarlı sınır değeri ≤16 µ/ml kabul edildiğinden izolatımızı duyarlı kabul ettik (Tablo 22) (100).

Streptomisinin 48 saat inkübasyonda MİK değerleri karşılaştırıldığında agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 arasında ve E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından anlamlı ilişki bulduk. 72 saat sonunda ise; agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 arasında ve E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından ilişki bulamadık (Tablo 27).

Yorumlama kategorisine göre değerlendirdiğimizde; agar dilüsyon yöntemi ile 43 suşun 48 ve 72 saatlik inkübasyonda streptomisine duyarlı olduğunu tespit ettik (%100). Aynı şekilde her iki E Test yönteminde de 43 suşun 48 ve 72 saatlik inkübasyonda doksisisikline duyarlı olduğunu tespit ettik (%100). Streptomisin için yorumlama kategorisini istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde agar dilüsyonla E Test arasındaki uyumu %100 bulduk.

## **SİPROFLOKSASİN**

Çalışmamızda siprofloksasinin agar dilüsyon yöntemi ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri 0,25 µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri 0,5µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK aralığı, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinde 1 kat dilüsyon artışı saptandı (Tablo 11).

E Test-1 ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 0.125-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 0.25 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.5 µg/ml olarak bulundu. 72 saat sonunda ise MİK aralığı 0,25-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 0.25 ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.5 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK aralığının 72 saat sonunda daraldığı, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin değişmediği görüldü (Tablo 12).

E Test-2 ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 0.125-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 0.25 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.5 µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 0,25-0.5 µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri ve MİK<sub>90</sub> değeri 0.5 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK aralığının 72 saat sonunda daraldığı, MİK<sub>50</sub> değerinin 1 kat dilüsyon arttığı ve MİK<sub>90</sub> değerinin değişmediği görüldü (Tablo 13).

Her üç testin siprofloksasin için MİK değerlerine bakıldığında; 48 saat inkübasyonda E Testlerde MİK aralığının, agar dilüsyon yöntemindeki 0.25 µg/ml aralığında 0.125-0.5 µg/ml'ye genişlediği, MİK<sub>50</sub> değerlerinin aynı olduğu ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin 1 kat arttığı saptandı. E Testlerde 72 saat sonunda MİK aralığının, agar dilüsyon yöntemindeki 0.5 µg/ml aralığında 0.25-0.5 µg/ml'ye genişlediği, MİK<sub>50</sub> değerinin E Test-1 yönteminde agar dilüsyon değerinden 1 kat dilüsyon azaldığı, MİK<sub>90</sub> değerinin ise her üç testte de aynı olduğu saptandı.

Siprofloksasinin 48 ve 72 saat inkübasyonda MİK değerleri karşılaştırıldığında agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 arasında ve E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından ilişki bulunmadı.

Yorumlama kategorisine göre değerlendirdiğimizde; agar dilüsyon yöntemi ile 43 suşun 48 ve 72 saatlik inkübasyonda siprofloksasine duyarlı olduğunu tespit ettik (%100). Aynı şekilde her iki E Test yönteminde de 43 suşun 48 ve 72 saatlik inkübasyonda siprofloksasine duyarlı olduğunu tespit ettik (%100). Siprofloksasin için yorumlama kategorisini istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde agar dilüsyonla E Test arasındaki uyumu %100 bulduk (Tablo28).

## **RİFAMPİSİN**

Çalışmamızda rifampisin için agar dilüsyon yöntemi ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 0.5-2µg/ml, MİK<sub>50</sub> değeri 1µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değerleri 2 µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 1-2 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri 2 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde 72 saat sonunda MİK aralığının daraldığı, MİK<sub>50</sub> değerinin 1 kat dilüsyon arttığı ve MİK<sub>90</sub> değerinde değişiklik olmadığı saptandı (Tablo 11).

E Test-1 ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 0.5-1µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 1µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 0.5-1 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 1 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK aralığı, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin aynı olduğu saptandı (Tablo 12).

E Test-2 ile 48 saat inkübasyon sonunda MİK aralığı 0.5-1 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 1µg/ml olarak bulundu. MİK aralığı 72 saat sonunda 0.5-2 µg/ml, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri 1 µg/ml olarak bulundu. Her iki saat dilimi değerlendirildiğinde MİK aralığının 72 saat sonunda genişlediği, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin aynı olduğu saptandı (Tablo 13).

Her üç testin rifampisin için MİK değerlerine bakıldığında; 48 saat inkübasyonda E Testlerde MİK aralığının, agar dilüsyon yöntemindeki 0.5-2µg/ml aralığında 0.5-1µg/ml

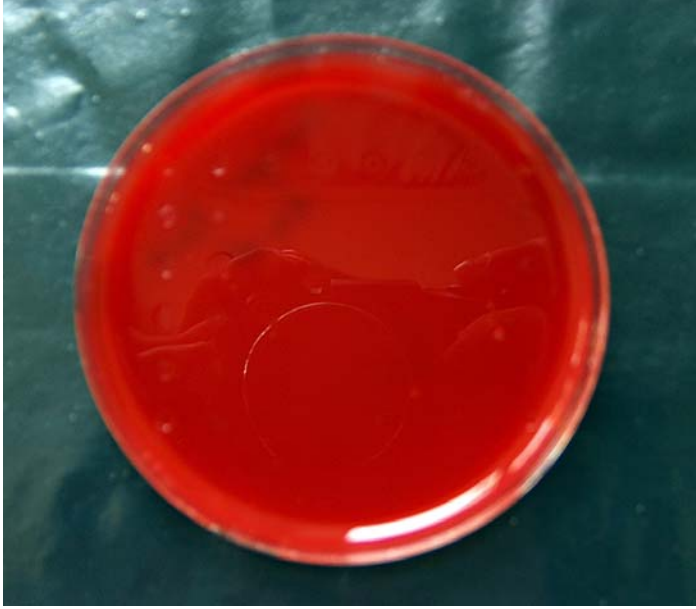
aralığına daraldığı, MİK<sub>50</sub> değerlerinin aynı olduğu ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin bir kat azaldığı saptandı. E Test-1 MİK aralığının 72 saat sonunda, agar dilüyon yöntemindeki 1-2 µg/ml aralığından 0.5-1 µg/ml aralığına 1 kat dilüsyon azaldığı, E Test-2 MİK aralığının ise 0,5-2 µg/ml aralığına genişlediği, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerinin her iki E Test yönteminde agar dilüsyon değerinden 1 kat dilüsyon düşük olduğu saptandı.

Rifampisin 48 saat inkübasyonda MİK değerleri karşılaştırıldığında agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 ve E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından anlamlı ilişki bulduk. Rifampisin 72 saat sonunda MİK değerleri karşılaştırıldığında ise; agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 arasında bir ilişki bulamazken, E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından ilişki bulduk.

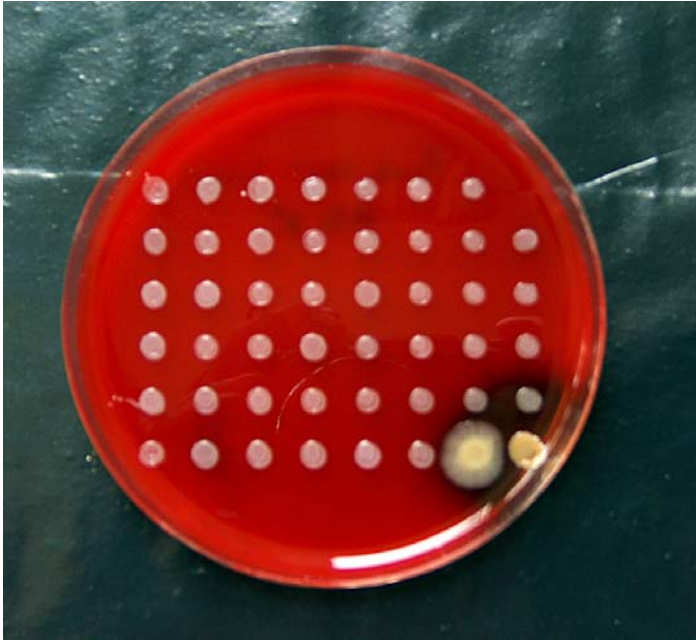
Yorumlama kategorisine göre değerlendirdiğimizde; agar dilüsyon yöntemi ile 48 saat inkübasyonda rifampisine 43 suşun 35'inin (%81) duyarlı, 8'inin (%19) ise orta derecede duyarlı olduğunu saptadık. Tüm suşlarımızdan 72 saat sonunda 2'sinin (%5) duyarlı, 41'inin (%95) ise orta derecede duyarlı olduğunu saptadık. E Test-1 yönteminde 43 suşun hepsinin (%100) 48 ve 72 saatlik inkübasyonda rifampisine duyarlı olduğunu saptadık. E Test-2 yönteminde ise 48 saat inkübasyonda rifampisine 43 suşun hepsinin (%100) duyarlı, 72 saat sonunda ise 43 suşun 39'unun (%91) duyarlı 4'ünün (%9) orta derecede duyarlı olduğunu saptadık. Her üç testi karşılaştırdığımızda; 48 saat inkübasyon sonunda 8 izolatı, agar dilüsyon yöntem ile rifampisine orta derece duyarlı bulurken aynı 8 izolatı her iki E Test yöntemi ile duyarlı bulduk. 35 izolatı, agar dilüsyon yöntem ile rifampisine orta derece duyarlı bulurken aynı 35 izolatı her iki E Test yöntemi ile duyarlı bulduk. 72 saat inkübasyon sonunda ise; 41 izolatı, agar dilüsyon yöntemi ile rifampisine orta derece duyarlı bulurken, E Test-1 yöntemi ile aynı 41 izolattı duyarlı bulduk, aynı şekilde 2 izolatı agar dilüsyon yöntemi ile rifampisine duyarlı bulurken E Test-1 yöntemi ile aynı 2 izolatı yine duyarlı bulduk. E Test-2 yöntemi ile 4 izolatı rifampisine orta derece duyarlı bulurken agar dilüsyon yöntemi ile aynı 4 izolattı orta derece duyarlı bulduk. Agar dilüsyon yöntemi ile 2 izolatı rifampisine duyarlı bulurken E Test-2 yöntemi ile aynı 2 izolatı yine duyarlı bulduk. Rifampisin için yorumlama kategorisini istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde agar dilüsyonla E Test arasındaki uyumu %83 bulduk.

Çalışmamızda kullanılan metotlara ait besiyeri ve antibiyotiksiz besiyeri kontrol petriyelerinin görünümü Resim 1 ve 2'de, çalışmamızda test edilen antimikrobilyallere ait agar dilüsyonla 48 saat inkübasyonda elde edilen MİK aralığı değerlerindeki kolonilerin görünümleri Resim 3-5-7-9'da, 72 saat sonunda MİK değerlerindeki değişiklikler Resim 4-6-

8-10'da görülmektedir. Ayrıca bu antimikrobiyaller test edildiğinde örnek olarak seçilen 32. izolatımıza ait E Test ile 48 saat inkübasyonda elde edilen MİK değerleri Resim 11 ve 13'de, 72 saat sonunda MİK değerlerindeki değişiklikler Resim 12 ve 14'de görülmektedir.



**Resim 1. Besiyeri kontrol petrisi**



**Resim 2: Antibiyotiksiz besiyeri kontrol petrisi**



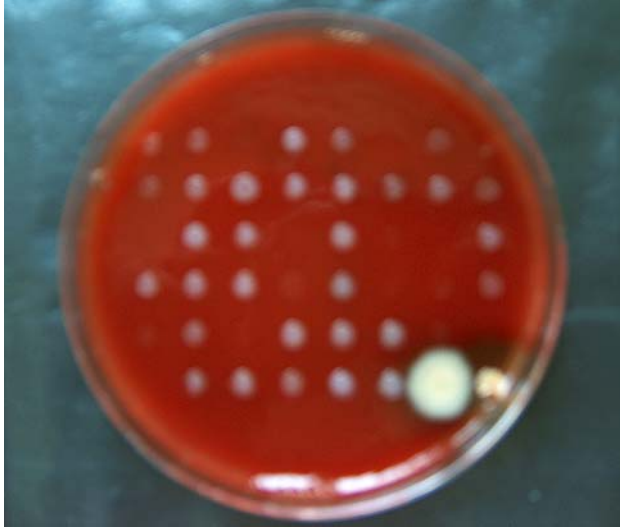
0.125 µg/ml

0.06 µg/ml

0.03 µg/ml

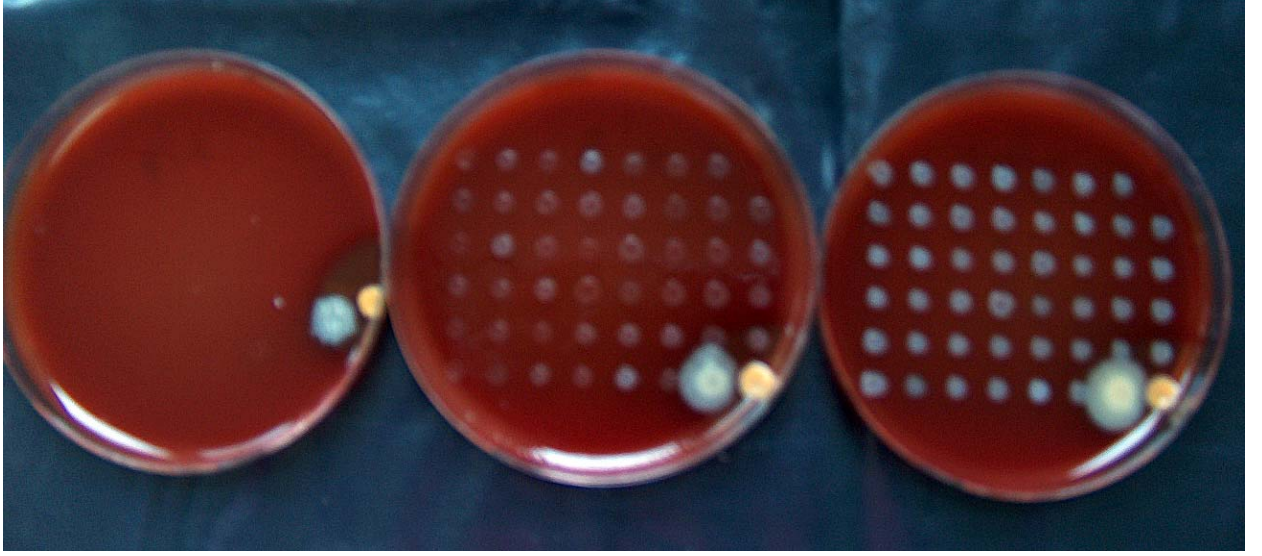
0.015 µg/ml

**Resim 3: Doksisisiklin içeren petrilere 48 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü**



0.125 µg/ml

**Resim 4: 0.125 µg/ml doksisisiklin içeren petride 72 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü**

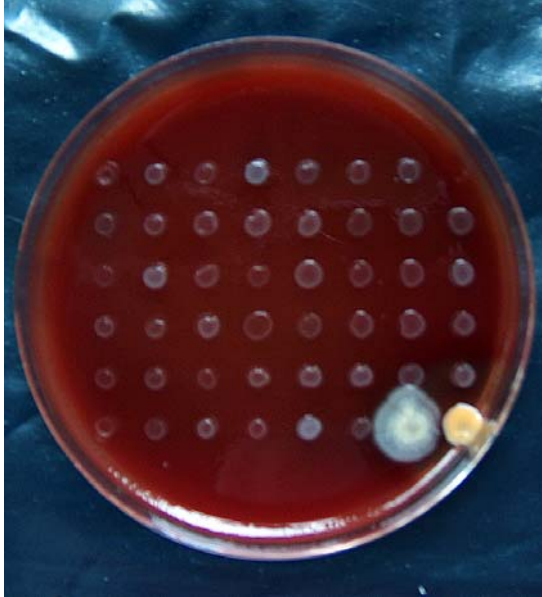


4 µg/ml

2 µg/ml

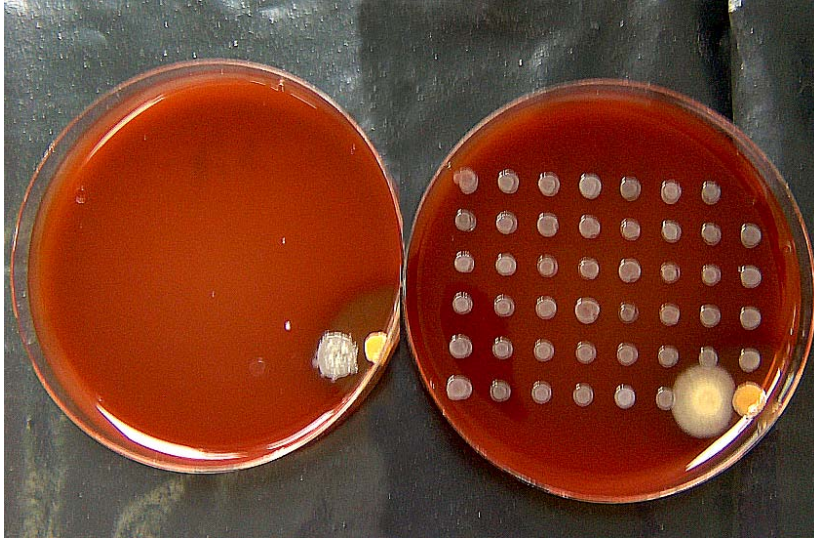
1 µg/ml

**Resim 5: Streptomisin içeren petrilerde 48 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü**



2 µg/ml

**Resim 6: 2 µg/ml streptomisin içeren petride 72 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü**



0.25 µg/ml

0.125 µg/ml

**Resim 7: Sipofloksasin içeren petrilerde 48 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü**



0.25 µg/ml

**Resim 8: 0.25 µg/ml siprofloksasin içeren petride 72 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü**



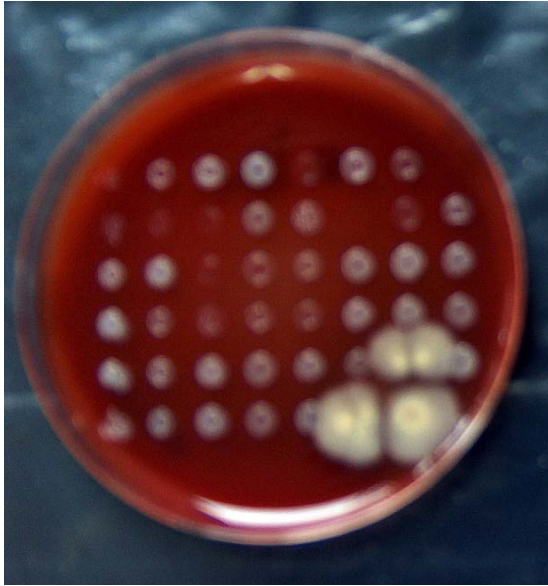


2 µg/ml

1 µg/ml

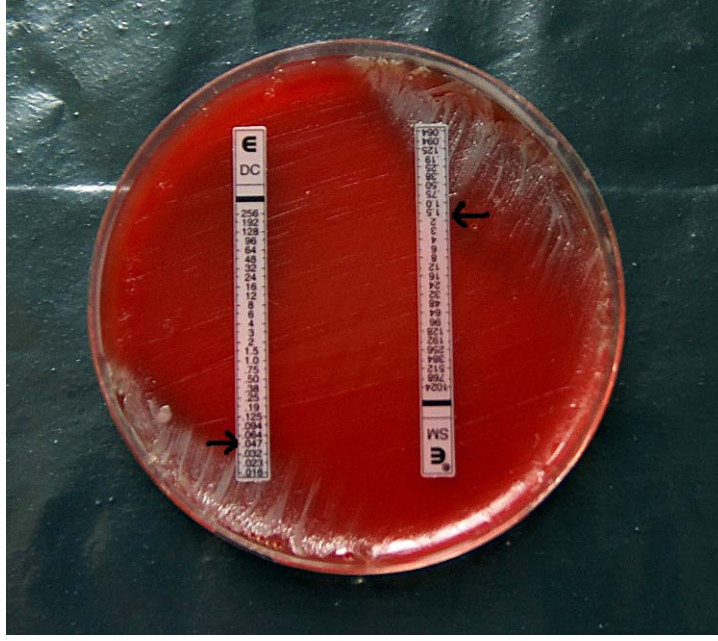
0.5 µg/ml

**Resim 9: Rifampisin içeren petrilere 48 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü**



1 µg/ml

**Resim 10: 1 µg/ml rifampisin içeren petride 72 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü**

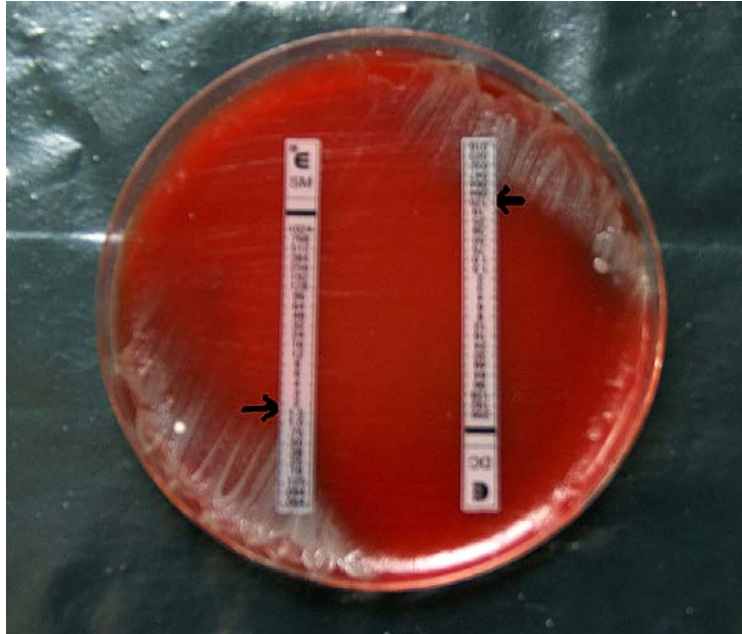


0.047 µg/ml (0.06 µg/ml)<sup>2</sup>

1.5 µg/ml (2 µg/ml)<sup>2</sup>

**Resim 11: Doksisisiklin ve streptomisin E Test ile test edildiğinde 48 saat inkübasyonda oluşan inhibisyon zonu ve MİK değerleri**

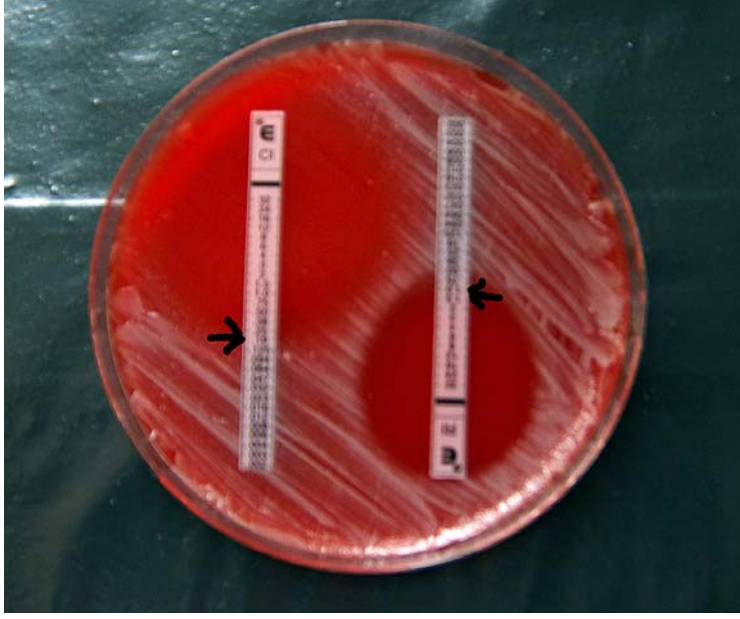
(\*: rapor edilirken agar dilüsyon değerine yuvarlanan değer)



1.5 µg/ml (2 µg/ml) <sup>2</sup> 0.064 µg/ml (0.125<sup>2</sup> µg/ml)

**Resim 12: Doksisisiklin ve streptomisin E Test ile test edildiğinde 72 saat inkübasyonda oluşan inhibisyon zonu ve MİK değerleri**

(\*: rapor edilirken agar dilüsyon değerine yuvarlanan değer)



0.25 µg/ml

1 µg/ml

**Resim 13: Rifampisin ve siprofloksasin E Test ile test edildiğinde 48 saat inkübasyonda oluşan inhibisyon zonu ve MİK değerleri (32. izolata aittir)**



1.5 µg/ml (2 µg/ml)<sup>2</sup>

0.25 µg/ml (0.25 µg/ml)<sup>2</sup>

**Resim 14: Rifampisin ve siprofloksasin E Test ile test edildiğinde 72 saat inkübasyonda oluşan inhibisyon zonu ve MİK değerleri (32. izolata aittir)**

(\*: rapor edilirken agar dilüsyon değerine yuvarlanan değer)

## TARTIŞMA

Bruselloz, dünyanın birçok yerinde görülen, iş gücü kaybı ve ekonomik kayıplara neden olan insanlara hayvan ürünlerinden doğrudan veya dolaylı olarak bulaşan ve Türkiye’de endemik olan bir zoonozdur (4). Ülkemizde bruselloz için temel bulaş kaynağı hastalığın endemik olduğu diğer ülkelerde olduğu gibi pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimidir. Hastalık insidansı, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde en yüksek iken, Akdeniz bölgesinde en düşüktür. Ülkemizde özellikle hayvancılığın yoğun olduğu kırsal kesimde daha sıklıkla görülmekte (104) ve kırsal kesimde daha çok *B. melitensis* infeksiyonu görülürken, büyük şehirlerde daha çok *B. abortus* infeksiyonuna rastlanmaktadır (2). Ülkemizde *B. canis* infeksiyonu bildirilmişken ulaşılabilen yayınlara göre *B. suis* infeksiyonu ise bildirilmemiştir (2,104). Türkiye’de hastalık etkeni olarak izole edilen türlerin büyük çoğunluğu *B. melitensis*’tir (104) ve en yaygın suş *B. melitensis* biyotip 3’tür (48). Ülkemizde brusellozun yıllık mortalite hızı milyonda 0.01’dir (104).

Brusellozun özgün tanısı, kan, kemik iliği, BOS, eklem sıvısı, periton ve plevra sıvısı, sperm gibi örneklerde *Brucella* bakterilerinin üretilmesi veya uygun klinik tablo varlığında standart tüp aglütinasyon testinde 1/160 ve üzerindeki titrelerin varlığı ile konmaktadır (6,104). Son yıllarda otomatize kan kültürü sistemleri ile *Brucella* bakterilerinin daha hızlı üretilbildiği (3,18,104), yedi günlük kan kültürü protokolleri ile %95’in üzerinde pozitiflik saptayabildiği bildirilmektedir (50).

Bruselloz sağaltımında kombine ve uzun süreli antibiyotik kullanımı gerekliliği tartışmasızdır. Sağaltımda amaç akut hastalığı kontrol altına almak, komplikasyon ve nöksleri önlemektir (104). DSÖ’nün en son önerdiği tedavi rejimi en az 6 hafta süreyle doksisisiklin

(200 mg/gün) ve rifampisin (600-900 mg/gün) kombinasyonudur. Alternatif olarak streptomisin (1 g/gün, intramüsküler, 14 gün süreyle) ve doksisisiklin (200mg/gün, 6 hafta süreyle) veya tetrasiklin (2 g/gün, 4 eşit dozda, 6 hafta süreyle) kombinasyonu önerilmektedir (6). Florokinolonlar, oral biyoyararlanımları, yüksek doku konsantrasyonları ve fagositik hücrelerdeki yüksek hücre içi konsantrasyonları ile bruselloz tedavisinde alternatif bir seçenek olarak düşünülmektedir (77). *Brucella* cinsi bakteriler hücre içi patojenlerdir ve fagolizozom gibi asidik ortamlara (~5.4) direnç gösterirler. Başarılı bir tedavi için hücre içine penetre olabilen antibiyotikler gerekmektedir (105,106). Hastalığın önemi kronik morbiditeye yol açmasıdır. Bruselloz tedavisinde ideal olan, tedavi başarısızlığını ve nüks yüzdesini minimize etmektir (107). Ayrıca uzun süreli kombine tedavi ihtiyacı, kullanılan ilaçların yan etkileri de yeni ilaçların aranmasına neden olmaktadır.

Hücre içinde çoğalan ve yaşamlarını sürdürebilen *Brucella* bakterileri, bağışıklık sisteminden korunabilme yeteneğine sahip olduğundan birçok antibiyotiğin etkisinden korundukları görülüyor. Bu da intrasellüler bakterilerinin konak hücrelerine sadece zarar vermekle kalmayıp nüklere de neden oluşunun kantıdır. Antibiyotiklerin intrasellüler bakterilere karşı etkileri zayıf olduğu için dirençli mutantlar da gelişebiliyor (108).

*Brucella* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte, *Brucella* duyarlılık testleri pratikte rutin olarak kullanılmıyor (14). Bu gibi testler laboratuvar personeli arasında kontaminasyon riski taşır ve biyogüvenlik 3 düzeyini gerektirir. Ayrıca in vitro antimikrobiyal duyarlılık klinik etkinlikle her zaman paralellik göstermemektedir (11). Bu yüzden standardize edilmiş bir test yöntemi ya da sonuçların yorumlanmasına yönelik bir kılavuz yoktur ( 8,109).

*Brucella* cinsi bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının nasıl test edileceğini açıklayan EUCAST'ın hazırladığı, intrasellüler patojenlerin antibiyotik duyarlılığının saptanmasında kullanılacak yöntemleri içeren kılavuzunda iki teknik önerilmektedir: Ariza ve ark., Bosh ve ark.'nın (92,110,111) çalışmalarında önerilen agar dilüsyon yöntemi ve Hall ve ark.'nın (91,92) önerdiği broth dilüsyon yöntemi. Bu kılavuza göre *Brucella* bakterileri için agar dilüsyon yöntemiyle MİK değerlerinin tespitinde %1 hemoglobin ve %1 PoliViteX içeren MHA kültür ortamı olarak kullanılmalıdır. Alternatif olarak özellikle trimetoprim-sülfonamid'ler test edileceği zaman %5 koyun kanı veya %5 at serumu içeren MHA kullanılabilir. İnokulum yoğunluğu  $10^4$  CFU/ml olmalı ve 18-48 saat  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyon yapılmalıdır. *Brucella* bakterileri için Broth dilüsyon yöntemiyle MİK değerlerinin tespitinde ise, %1 hemoglobin ve %1 PoliViteX içeren *Brucella* broth

kullanılmalıdır. İnokulum 24 saat broth kültürde inkübe edilmiş 0.5 McFarland yoğunluğuna ayarlanmalıdır. 37°C’de 48 saat %5 CO<sub>2</sub>’li ortamda inkübasyon yapılmalı, *B. ovis* suşları test edilecekse 7 gün boyunca durum değerlendirilmelidir (92).

Turkmani ve ark. (10), doğu akdenizden izole edilen 57 tanesi klinik örneklerden 17 tanesi hayvan ürünlerinden elde edilen 74 *Brucella* izolatının antibiyotik duyarlılıklarını araştırmışlar. Bu izolatların 11 antibiyotiğe (tetrasiklin, rifampisin, streptomisin, gentamisin, norfloksasin, siprofloksasin, levofloksasin, trimetoprim-sulfometoksazol, ampisilin, amoksisilin/ klavulanik asit, eritromisin) karşı duyarlılıklarını E Test yöntemi ile test etmişler. Tüm suşları *B. melitensis* olarak tanımlamışlar. %5 Koyun kanı içeren ve 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> CFU/ml yoğunluğundaki inokulum ekilmiş MHA plaklarını, E Test striplerini yerleştirdikten sonra 35°C’de 48 saat inkübe etmişler. En yüksek MİK<sub>50</sub> değerini norfloksasin ve eritromisin (1.5 µg/ml), en düşük MİK<sub>50</sub> değerini tetrasiklin (0.125 µg/ml) ve en yüksek MİK<sub>90</sub> değerini eritromisin (4 µg/ml), en düşük MİK<sub>90</sub> değerini tetrasiklin, siprofloksasin, levofloksasinle (0.5 µg/ml) elde etmişler. İzolatların 2’si 1.5 µg/ml rifampisinle inhibe olmuş. Bunu direnç değil azalmış duyarlılık olarak yorumlamışlar. İzolatların 8’i trimetoprim-sulfometoksazole orta derece duyarlı bulunmuş. Tüm izolatlar diğer antibiyotiklere duyarlı bulunmuş. Streptomisin ve gentamisinin MİK değerlerinin diğer çalışmalarda olduğu gibi düşük bulunduğunu; kinolonların MİK değerlerini düşük bulmalarına karşın in vivo etkinliklerinin hala tartışmalı olduğunu; ampisilin, amoksisilin/ klavulanik asit, eritromisinin in vivo bruselloz tedavisinde başarısız olduğu bilindiği halde araştırma amaçlı test ettiklerini ve ampisilin, amoksisilin/ klavulanik asitin MİK değerlerini düşük buldukları halde bunun terapötik tedaviyle bağlantılı olmadığını söylemişlerdir. Sonuç olarak rifampisinin tüberküloz tedavisi için saklanması ve diğer antibiyotiklerin bu yüzden duyarlılıklarının belirlenmesi, antibiyotik duyarlılık testlerinin kritik noktalarda tedaviye yardımcı olma, epidemiyolojik araştırmalar, potansiyel salgınların önlenmesi için geliştirilmesi gerektiğini savunmuşlar ve bu nedenle de basit, güvenilir ve düşük maliyetli bir *Brucella* antibiyotik duyarlılık testi metodunun bulunmasının ilaç direncinin oluşmasından önce saptanmasının faydalı olacağını öne sürmüşlerdir.

Marianelli ve ark. (14), İtalya- Sicilya’da *Brucella* izolatlarının epidemiyolojik, moleküler ve antibiyotik duyarlılık karakterizasyonunu saptamak amacıyla yaptıkları bir çalışmada; brusellozlu 20 hastadan alınan izolatları BACTEC 9120 sistemiyle 37°C’de 7 gün içinde tespit etmişler. Klasik tanımlama yöntemleriyle tüm izolatları *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlamışlar. Antibiyotik duyarlılığını E Test yöntemiyle iki farklı agar kullanarak test etmişler ve sonuçları karşılaştırmışlar. %5 Koyun kanı içeren MHA ve %5 at serumu

içeren *Brucella* agar plaklarına 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış inokulumu ekip, E Test striplerini yerleştirmişler ve bu plakları 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’li ortamda 48 saat inkübe etmişler. Kullanılan iki farklı kültür ortamında anlamlı olmayan farklılıklar bulmuşlar. En düşük MİK değerlerini trimetoprim-sulfametoksazol (MİK aralığı: 0.012-0.064 µg/ml) ve en yüksek MİK değerlerini rifampisin (MİK aralığı: 0.75- 2 µg/ml) ile elde etmişler. İzolatların 2 tanesini rifampisine orta derecede duyarlı olarak yorumlamışlar ve izolatların tamamını diğer antibiyotiklere duyarlı bulmuşlar. Çalışmalarında *Ether* ve rifampisin antibiyotiğinin kontrolü için rifampisine dirençli tek *Brucella* referans suşu olan *RB51* referans suşlarını kullanmışlar. İzolatlar için buldukları MİK aralıklarını *Ether* suşunun MİK değerleri ile karşılaştırdıklarında anlamlı farklılıklar bulamamışlar. Ayrıca tüm izolatlarında prokaryotlarda rifampisin antibiyotiğinin hedefi olan *rpoB* genini ve rifampisine orta derecede duyarlı olan 2 izolatta *B. melitensis* biyotip 3 moleküler marker’ını (M1249I) tespit etmişler. Bu nedenle araştırılan tüm izolatların genelde tüm test edilen antimikrobiyallere ve rifampisine duyarlı bulunabileceğini iddia etmişler. Sonuç olarak, *Brucella* türlerinin antibiyotik duyarlılığının tespitinde kolay uygulanması, zaman kaybına yol açmaması ve daha az emek gerektirmesi nedeniyle E Test yönteminin; her iki kültür ortamında anlamlı farklılıklar olmadığı halde inhibisyon zonunun net görülmesinden ve MİK kalibresini belirten striplerin daha kolay okunabilir olmasından dolayı MHA kültür ortamının tercih edilebileceğini; endemik olan bölgelerde ilaç direncinin erken tespiti için çoğu yaygın kullanılan bu antibiyotiklere suşların duyarlılığının aralıklarla değerlendirilmesi gerekliliğini öne sürmüşlerdir.

Bodur ve ark. (112), 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada 41 *Brucella* izolatının biyotiplerini tanımlamış ve antimikrobiyal duyarlılıklarını tespit etmişler. Bu izolatların 39 tanesini *B. melitensis* biyotip 3, iki tanesini de *B. melitensis* biyotip 1 olarak tanımlamışlar. Antibiyotik duyarlılıklarını E Test yöntemi ile test etmişler. %5 koyun kanı içeren MHA plaklarına son inokulum 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> olacak şekilde ekim yapmışlar, E Test striplerini yerleştirip bu plakları 35°C’ de normal atmosfer koşullarında 48 saat inkübe etmişlerdir. MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla; doksisisiklin için 0.064 µg/ml, siprofloksasin için 0.25 µg/ml, seftriakson ve trimetoprim-sulfometoksazol için 0.38 µg/ml, rifampin için 0.75 µg/ml olarak tespit etmişler. Buna göre doksisisiklin en düşük MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri gösterirken rifampisin en yüksek MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri göstermiştir. Sonuç olarak, *Brucella* türlerine karşı kullanılan geleneksel anti-*Brucella* antibiyotiklerinin in vitro aktif olduğunu, bu yüzden rutinde *Brucella* türlerine karşı antibiyotik duyarlılık testlerinin gerekli olmadığını fakat antimikrobiyal direncin aralıklarla saptanmasının gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Köse ve ark. (113), 2005 yılında brusellozlu hastalardan elde edilen 11 izolatu tanımlamışlar ve izolatların tamamını *B. melitensis*, bunların 10 tanesini *B. melitensis* biyotip 3 1 tanesini de *B. melitensis* biyotip 1 olarak tespit etmişler. Türleri; CO<sub>2</sub> gereksinimleri, üreaz etkileşimleri, H<sub>2</sub>S üretimi, boyalarda üreme, *Brucella* faj ve monospesifik antiserumlara verdikleri aglütinasyon özelliklerine göre belirlemişler. Antibiyotik duyarlılıklarını E Test yöntemi ile test etmişler. 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteriyal inokulum ekilmiş ve E Test stripleri yerleştirilmiş %5 koyun kanı içeren MHA plaklarını 37°C'de 48 saat inkübe etmişler. MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla; doksisisiklin için 0.047 µg/ml, siprofloksasin için 0.25 µg/ml, seftriakson için 0.5 µg/ml, rifampin için 0.75 µg/ml ve trimetoprim-sulfometoksazol için 1 µg/ml olarak tespit etmişler. Buna göre doksisisiklin en düşük MİK<sub>90</sub> değeri gösterirken trimetoprim-sulfometoksazol en yüksek MİK<sub>90</sub> değeri göstermiş. Tüm izolatları doksisisiklin, rifampin, siprofloksasin ve seftriaksona duyarlı, 11 izolatu yalnızca 1'i trimetoprim-sulfometoksazole yarı duyarlı bulmuşlar. Sonuç olarak, Türkiye'den bildirilen E Test yöntemiyle yapılan birçok çalışmayla uyumlu sonuçlar elde ettiklerini ve E Testin broth mikrodilüsyon yöntemine göre kolay uygulanabilir, fazla emek gerektirmeyen ve zaman kazandırıcı özellikleri nedeniyle *Brucella* türlerinin antibiyotik duyarlılığının saptanmasında kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Baykam ve ark. (114), 2004 yılında 42 *Brucella* suşunun in vitro antibiyotik (seftriakson, doksisisiklin, rifampisin, siprofloksasin, co-trimaksazol) duyarlılığını E Test yöntemi ile test etmişler. Bu suşların 37 'sini *B. melitensis*, 5'ini *B. abortus*; *B. melitensis*'lerin 29'unu *B. melitensis* biyotip 3, 8'ini *B. melitensis* biyotip 1 olarak tanımlamışlar. E Test stripleri yerleştirilmiş %5 koyun kanı içeren MHA plaklarını 35°C'de 48 saat inkübe etmişler. MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla; doksisisiklin için 0.06 µg/ml, siprofloksasin için 0.19 µg/ml, seftriakson için 0.5 µg/ml, rifampisin için 1 µg/ml ve co-trimaksazol için 1.5 µg/ml olarak tespit etmişler. Doksisisiklinle en düşük, rifampisinle en yüksek MİK<sub>50</sub> ve doksisisiklinle en düşük, co-trimaksazolle en yüksek MİK<sub>90</sub> değerleri saptamışlar. Suşların tamamı seftriakson, doksisisiklin ve siprofloksasine duyarlı iken 4 suş (2'si *B. melitensis* biyotip 3, 2'si *B. melitensis* biyotip 1) rifampisine orta derece duyarlı, 1 suş (*B. melitensis* biyotip 3) da co-trimaksazole dirençli olarak saptanmış. Sonuç olarak *Brucella* türlerine karşı yaygın olarak kullanılan antimikrobiyallerin in vitro olarak etkili olduğunu, Türkiye'de yapılan birçok çalışmadaki sonuçlarla uyumlu sonuçlar bulduklarını, yine birçok çalışmada olduğu gibi bruselloz tedavisinde kullanılan doksisisiklinin en aktif antimikrobiyal olduğunu, Türkiye'de anlamlı direnç olmamasına rağmen tüberküloz gibi hastalıklarda yaygın



olarak kullanılan rifampisinin bölgesel duyarlılığının aralıklarla test edilmesi gerekliliğini öne sürmüşlerdir.

Ayaşlıoğlu ve ark. (11), kan örneklerinden izole ettikleri 46 *Brucella* izolatının antimikrobiyal duyarlılıklarını saptamışlar. İzolaların 45'ini *B. melitensis* biyotip 3, 1'ini de *B. melitensis* biyotip 1 olarak tanımlamışlar ve bu izolatlara karşı tetrasiklin, streptomisin, siprofloksasin, azitromisin ve rifampin antimikrobiyallerinin in vitro etkinliğini E Test yöntemi ile araştırmışlar. 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakteriyal inokulum ekilmiş ve E Test stripleri yerleştirilmiş %5 koyun kanı içeren MHA plaklarını 48 saat inkübe etmişler. MİK<sub>50</sub> değerleri tetrasiklin ve siprofloksasin 0.125 µg/ml, streptomisin 0.25 µg/ml, rifampin 0.5 µg/ml, azitromisin 0.75 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değerleri ise tetrasiklin ve siprofloksasin 0.25 µg/ml, streptomisin 0.5 µg/ml, rifampin ve azitromisin 1 µg/ml olarak tespit edilmiş. En düşük MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri tetrasiklin ve siprofloksasinde izlenirken en yüksek MİK<sub>50</sub> değeri azitromisin, MİK<sub>90</sub> değeri ise rifampin ve azitromisinde görülmüş. Tüm izolatlar tetrasiklin, streptomisin, siprofloksasin ve azitromisine duyarlı iken, 44 izolat rifampisine duyarlı 2 izolat ise orta derece duyarlı olarak tespit edilmiş. Sonuç olarak klasik tedavi rejiminde kullanılan tetrasiklin, streptomisin ve rifampinin yanında iki alternatif antibiyotik olan siprofloksasin ve azitromisinin de in vitro etkinliklerinin iyi olduğunu; siprofloksasinin özellikle tetrasikline yakın MİK değerleri gösterdiğinden dolayı kombine tedavi için iyi bir aday olduğunu, azitromisinin ise in vitro iyi olmasına karşın klinik olarak daha fazla araştırılması gerektiğini savunmuşlardır.

Turan ve ark. (107), 82 *Brucella* suşuna karşı tigesiklin, doksisisiklin, siprofloksasin ve rifampin duyarlılığını E Test yöntemi ile incelemişler. Tüm suşları *B. melitensis* olarak tanımlamışlar. %5 Koyun kanı içeren MHA plaklarına 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış inokulumu ekip, E Test striplerini yerleştirdikten sonra, plakları 35°C'de 48 saat inkübe etmişler. Çalışmada doksisisiklin en düşük, rifampisin en yüksek MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerine sahip bulunmuş. Doksisisiklin, tigesiklin, siprofloksasin ve rifampisin MİK<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.016 µg/ml, 0.064 µg/ml, 0.094 µg/ml ve 0.75 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla 0.047 µg/ml, 0.125 µg/ml, 0.19 µg/ml ve 1.5 µg/ml olarak bulunmuş. Tigesiklin doksisisiklin kadar olmasa da siprofloksasin ve rifampisinden daha etkin aktivite göstermiş. Ayrıca tüm suşlar doksisisiklin ve siprofloksasine karşı duyarlı bulunmuşken 63 suşun rifampisine duyarlı, 19 suşun ise orta derecede duyarlı olduğunu tespit etmişler. Bu verilere göre tigesiklinin, doksisisiklin kadar etkili olmasa da diğer antibiyotiklerle mukayese edildiğinde düşük MİK

değerlerine sahip olduğundan tedavide alternatif olarak kullanılabilceği ancak bunun in vivo olarak ispatlanması gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Zer ve ark. (115), 39 *Brucella* suşuna karşı klasik tetrasiklinlerin semi-sentetik analogu olan tigesiklinin in vitro etkinliğini E Test yöntemiyle test etmişler. %5 Koyun kanı içeren MHA plaklarına 1 McFarland bulanıklığa ayarlanmış inokulumu ekip, E Test striplerini yerleştirdikten sonra, plakları 37°C' de 48 saat inkübe etmişler. Tüm suşları *B. melitensis* olarak tanımlamışlar ve tigesiklinin MİK aralığını <0.016-0.094 µg/ml olarak oldukça düşük bulmuşlar. Standart tedavi rejimlerinin dezavantajları, nükslerin varlığı, tüberkülozun endemik olduğu bölgelerde rifampisine direnç olması gibi sebeplerden dolayı alternatif tedavi arayışlarının ortaya çıkması nedeniyle tigesiklinin in vitro etkinliğini ispatlamaya çalışmışlar ve etkin olduğunu iddia etmişler. Ancak bunun in vivo çalışmalarla da desteklenmesi gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Kaya-Fırat ve ark. (116), 1999-2002 yılları arasında 30 hastadan izole ettikleri *B. melitensis* suşuna karşı rifampisin, tetrasiklin, streptomisin antimikrobisyonlarının in vitro duyarlılıklarını E Test ile tespit etmişler. Bu üç antimikrobisyonun önce her suş için MİK değerlerini tespit etmişler, sonra kombinasyonlarının her suş için FİC indekslerini hesaplamışlar. Araştırma sonucunda MİK aralıklarını rifampisin için 0.25-2 µg/ml, tetrasiklin için 0.016-1 µg/ml ve streptomisin için 0.094-1.5 µg/ml olarak tespit etmişler. Antimikrobisyonların kombinasyonunda ise; streptomisin- tetrasiklin kombinasyonunda %66.7 sinerji (20 suş), %33.3 indifferens (10 suş); rifampisin- tetrasiklin kombinasyonunda %87 sinerji (26 suş), %13 indifferens (4 suş); streptomisin- rifampisin kombinasyonunda ise %60 sinerji (18 suş), %37 indifferens (11 suş) ve %3 antagonizma (1 suş) tespit etmişler. Bu sonuçlara göre; in vitro diğer kombinasyonlarla karşılaştırıldığında en iyi etkili olanın rifampisin- tetrasiklin kombinasyonu olduğu ve rutinde *Brucella* için antimikrobisyon duyarlılık testleri tavsiye edilmemesine rağmen tedavide yetersizlik, nüksler ve tekrarlayan enfeksiyonlar nedeniyle E Testle sinerji testleri uygun tedavi seçiminde yardımcıdır tezini savunmuşlardır.

Kılıç ve ark. (109), 16 *B. melitensis* suşunu kullanarak E Test yöntemiyle geleneksel antimikrobisyon kombinasyonlarının aktivitesini ölçmeyi amaçlamışlar. Tüm suşları *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlamışlar. Antibiyotiklerin tek başlarına MİK değerlerini de E test yöntemi ile tespit etmişler. Sinerji testinde E Test predifüzyon yöntemini kullanmışlar. %5 Koyun kanı içeren MHA plaklarına 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış inokulum ekip, E Test striplerini yerleştirdikten sonra, plakları 35°C'de normal atmosfer koşullarında 48 saat

inkübe etmişler. MİK<sub>50</sub> değerlerine göre en aktif antibiyotikler trimetoprim-sulfometoksazol (0.064 µg/ml) ve moksifloksasin (0.064 µg/ml), en az aktif antibiyotik ise rifampisin (1.5 µg/ml); MİK<sub>90</sub> değerlerine göre ise en aktif antibiyotik trimetoprim-sulfometoksazol (0.094 µg/ml) ,en az aktif antibiyotik rifampisin (2 µg/ml) bulunmuş. Sinerji testinde ise en yüksek sinerjiyi rifampisin kombinasyonları ( rifampisin- tetrasiklin, rifampisin- trimetoprim-sulfometoksazol) gösterirken, tetrasiklin- trimetoprim-sulfometoksazol kombinasyonunda en az sinerjistik aktivite gözlenmiş. Rifampisin dışındaki antibiyotiklere tüm izolatlar duyarlı iken, izolatları 12 tanesi rifampisine duyarlı, 4 tanesi ise orta derecede duyarlı bulunmuş. Çalışma sonucunda; Trimetoprim-sulfometoksazol MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin Türkiye’de yapılan diğer çalışmalardan daha düşük bulduklarını, streptomisinde ise daha önce yapılan çalışmalarda MİK aralıklarındaki değerlerde bulmalarına karşın MİK değerlerinin diğer çalışmalardan çok daha düşük olduğunu, bu farklılıkların da farklı in vitro yöntem kullanımına bağlı olduğunu öne sürmüşler. Sinerjistik aktivite tespitinde diğer çalışmalarla arasındaki farklılığı ise; farklı yöntemle yapılan E Test yöntemine ve *B. melitensis* suşlarının bölgesel duyarlılık farklılıklarına bağlamışlar. Sinerji- antagonizma tespitinde predifüzyon tekniği ile E Test kullanımının zaman avantajı açısından tarama testi olarak kullanılabileceğini iddia etmişler ancak antibiyotiklerin sadece in vitro testlerle değil klinik çalışmalarla da ispatının yapılması gerekliliğini ortaya koymuşlar.

Orhan ve ark. (12), *B. melitensis* suşlarına karşı kullanılan antimikrobiyal kombinasyonlarının (rifampisin+doksisiklin, rifampisin+trimetoprim-sulfometoksazole, trimetoprim-sulfometoksazole+doksisiklin, streptomisin+doksisiklin ve azitromisin+siprofloksasin) E Test ve dama tahtası metodunu kullanarak sinerji testlerini yapmışlar. %5 Koyun kanı içeren MHA plaklarına 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış inokulumu ekip, kombinasyonları test edilecek antimikrobiyallerin E test striplerini 90° açı oluşturacak şekilde yerleştirmişler. Plakları 35°C’de 48 saat inkübe etmişler. Dama tahtası metodunda MHB besiyeri kullanarak 5x10<sup>5</sup> CFU/ml inokulum içeren mikropleyleri 35°C’de 48 saat inkübe etmişler. Her iki testle antibiyotik kombinasyonlarının FİC indekslerini hesaplamışlar. Bu testler sonucunda en düşük MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerlerini doksisiklinle elde etmişler. E Test yöntemiyle izolatların tamamı streptomisin ve trimetoprim-sulfometoksazole duyarlı bulunurken siprofloksasine %93.75, rifampisine %93.73, doksisikline %75, azitromisine %68.75 duyarlı; dama tahtası metoduyla ise sırasıyla aziromisine %93.75, streptomisine %81.25, siprofloksasin, trimetoprim-sulfometoksazole ve rifampisine %75, doksisikline %68.75 duyarlı bulunmuş. Kombinasyonlarda bu iki testle en iyi uyumun

rifampisin+doksisiklin kombinasyonunda (%63.75), en az uyumun da trimetoprim-sulfometoksazole+doksisiklin kombinasyonunda (%13.75) olduğunu; tüm kombinasyonlar göz önüne alındığında E Test ile dama tahtası yönteminin birbirleriyle %55 uyumlu olduğunu bulmuşlar. Sonuç olarak E Test yöntemi ile dama tahtası metodunun birbiriyle uyumlu sonuçlar verdiğini, dama tahtası metodunun rutin antimikrobiyal sinerjinin saptanmasında zaman alıcı ve zor uygulanabilir E Testin yönteminin ise kolay uygulanabilir ve zaman alıcı olmamasından dolayı sinerji testlerinde tercih edilebileceğini öne sürmüşler.

Eşel ve ark. (8), 74 *B. melitensis* suşunun altı farklı antibiyotiğe ( siprofloksasin, doksisiklin, rifampisin, streptomisin, seftriakson ve sulfometoksazol) duyarlılıklarını agar dilüsyon referans yöntemi ve E Test yöntemi ile araştırarak sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Agar dilüsyon yönteminde %5 koyun kanı içeren MHA plaklarına son inokulum  $10^4$  olacak şekilde ekim yapmışlar ve bu plakları  $35^{\circ}\text{C}$ 'de normal atmosfer koşullarında 48 saat inkübe etmişlerdir. E Test yönteminde de %5 koyun kanı içeren MHA plaklarını kullanmışlar ve  $35^{\circ}\text{C}$ ' de normal atmosfer koşullarında 48 saat inkübe etmişlerdir. Agar dilüsyon yönteminde en düşük  $\text{MİK}_{50}$  değerini doksisiklin (0.06  $\mu\text{g/ml}$ ), en yüksek  $\text{MİK}_{50}$  değerini rifampisin (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) ve streptomisin (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) ile; en düşük  $\text{MİK}_{90}$  değerini doksisiklin (0.125  $\mu\text{g/ml}$ ) ve en yüksek  $\text{MİK}_{90}$  değerini rifampisin (2  $\mu\text{g/ml}$ ) ile elde etmişler. E Test yöntemi ile en düşük  $\text{MİK}_{50}$  değerini doksisiklin (0.03  $\mu\text{g/ml}$ ) ve trimetoprim-sulfometoksazol (0.03/0.593  $\mu\text{g/ml}$ ), en yüksek  $\text{MİK}_{50}$  değerini rifampisin (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) ve streptomisin (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ); en düşük  $\text{MİK}_{90}$  değerini doksisiklin (0.06  $\mu\text{g/ml}$ ) ve trimetoprim-sulfometoksazol (0.06/1.187  $\mu\text{g/ml}$ ) ve en yüksek  $\text{MİK}_{90}$  değerini rifampisin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) ve seftriakson (1  $\mu\text{g/ml}$ ) ile elde etmişlerdir. E Test ile agar dilüsyon  $\text{MİK}$  değerlerini karşılaştırdıklarında; rifampisin ve seftriakson dışında diğer antibiyotikler için E Test yöntemi ile elde ettikleri  $\text{MİK}$  değerlerini agar dilüsyon yöntemi ile elde edilenlerden daha düşük bulmuşlar.  $\text{MİK}$  değerlerindeki en fazla uyumsuzluğu trimetoprim-sulfometoksazol'de görmüşler buna karşın sadece rifampisin için iki yöntem arasında uyum gözlemişler. Sonuçları suşların antibiyotiklere duyarlılığı açısından değerlendirdiklerinde; tüm suşların rifampisin dışındaki antibiyotiklere duyarlı olduğunu; rifampisine agar dilüsyon yöntemi ile suşların %19'unun, E Test yöntemi ile %1'inin orta derece duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Agar dilüsyon yöntemiyle rifampisine orta derece duyarlı bulunanlardan sadece 1'i E Test yöntemiyle orta derecede duyarlı bulunmuştur. Sonuç olarak E Test yönteminin sadece rifampisin için agar dilüsyon yöntemiyle uyumlu olduğunu, E Test yönteminin *B. melitensis* suşlarının duyarlılık durumlarının incelenmesinde kullanımının sınırlı olduğunu öne sürmüşlerdir.

Rolain ve ark.(117), 2000 yılında yayınladıkları bir çalışmada, *Brucella* ve *Bartonella* cinsi bakterileri birbirlerine filogenetik olarak yakın olduklarından Bruselloz tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin *Bartonella* ile ilgili hastalıklarda kullanılabilirliğini araştırmışlar. Bu nedenle her iki bakteri türünün bruselloz tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılığına bakmışlar. *Brucella* ve *Bartonella* suşlarına karşı doksisiklin, rifampisin, gentamisin, streptomisin, siprofloksasin, amoksisilin, seftriakson, eritromisin duyarlılıklarını agar dilüsyon yöntemi ile saptamışlar; *Brucella* kökenlerinin üç gün, *B. quintana*'nın 5 gün ve *B. henselae*'nin 6 gün sonunda üremelerini değerlendirmişler. *Brucella* cinsi bakterileri için en etkili antibiyotiklerin doksisiklin ve eritromisin, etkinliği en az antibiyotiğin ise streptomisin olduğu saptarken, *Bartonella* cinsi bakterileri için en etkili antibiyotiklerin amoksisilin ve seftriakson, etkinliği en az olan antibiyotiğin streptomisin olduğunu tespit etmişler. Sonuç olarak; *Brucella* ve *Bartonella* cinsi bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının benzer olduğu sonucuna varmışlar.

Bosch ve ark. (111), brusellozlu hastaların tedavilerinde yaygın olarak kullandıkları doksisiklin, siprofloksasin, seftriakson, streptomisin, tetrasiklin, rifampisin, trimetoprim-sulfometoksazolun in vitro aktivitelerini 95 *B. melitensis* üzerinde araştırmışlar. Agar dilüsyon yöntemi ile çalışılan antibiyotik duyarlılık testleri, 72 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda, tetrasiklin ile doksisiklinin en etkili antibiyotikler olduğunu saptamışlar (suşların % 100'ünü inhibe eden konsantrasyonları sırası ile 0.25 mg/l ve 0.5 mg/l). Çalışılan tüm antibiyotiklere karşı dirençli suş bulamamışlar. Sonuç olarak; siprofloksasin ve seftriakson dahil tüm antibiyotiklerin *B. melitensis*'e karşı in vitro olarak iyi etkinlik gösterdiğini ancak siprofloksasin ve seftriakson için saptanan ümit verici in vitro sonuçlara rağmen, bu iki antibiyotiğin bruselloz tedavisinde kullanılması için daha fazla in vitro ve in vivo çalışmalarının yapılması gerekliliğini öne sürmüşler.

Garcia-Rodriguez ve ark. (90) 1991 yılında yayımladıkları bir çalışmada; kinolon grubundan altı antibiyotiğin (siprofloksasin, ofloksasin, lemfloksasin, temofloksasin, flerofloksasin, sparfloksasin) etkinliğini 43 brusella kökeni üzerinde, farklı yöntemler (agar dilüsyon ve broth dilüsyon yöntemi), farklı inokulumlar ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ) ve farklı pH'lar (pH:5,pH:7) kullanarak test edip sonuçları karşılaştırmışlar. %1 hemoglobin ve %1 PoliViteX içeren, pH:5 ve pH:7'ye ayarlanmış MHA plaklarına her bakteri için ayrı ayrı hazırlanan  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  CFU/ml yoğunluğundaki inokulumları ekip 35°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 48 saat inkübe etmişler. Broth dilüsyon yönteminde ise; yine pH:5 ve pH:7'ye ayarlanmış MHB'a  $10^4$  CFU/ml yoğunluğunda olan inokulumu ekip 35°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 48 saat inkübe

etmişler. Agar dilüsyon yönteminde *B. melitensis*'e karşı test edilen kinolanlardan sparfloksasinin ve temafloksasinin pH:7'de en etkili olduğunu, sadece sparfloksasin ise pH:5'de en etkili kinolon olduğunu test edilen bütün kinolonların MİK değerlerinin pH:5'de pH:7'den 2 ila 4 kat yüksek olduğunu saptamışlar. *B. abortus*'a karşı ise fleroksasinin daha etkili olduğunu ve ayrıca MİK değerlerinin inokulum ve pH'daki farklılıklara rağmen çok da belirgin değişmediğini saptamışlar. Aynı bakteriler pH:7'de, hem broth dilüsyon hem agar dilüsyon ile çalışılıp sonuçlar karşılaştırıldığında broth dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değerlerinin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değerlerinden en az 2 ila 4 kat yüksek olduğunu, *B. abortus* için saptanan MİK değerlerinin *B. melitensis* için elde edilen MİK değerlerinden daha yüksek olduğunu ve bütün kinolonların *B. abortus*' a etkisiz olduğunu saptamışlar. Sonuç olarak; test koşullarındaki değişikliklerin orta derecede etkili olduğunu, pH:5 ve pH:7'de inokulum yoğunluğundaki artışların antibiyotiklerin aktivitesi üzerine belirgin etkisi olmadığını, florokinolonların özellikle pH:5'de hücre içi konsantrasyonlarının *Brucella* cinsi bakteriler üzerine bakterisidal etkilerinin yeterli düzeyde olmadığını ve birinci seçenek ilaçlar arasında düşünülmemeleri gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Palenque ve ark. (94), 83 *B. melitensis*'e karşı aztreonam ve yedi sefalosporin grubu antibiyotiğin (seftizoksime, seftriakson, sefotaksim, moksalaktam, sefoperazone, seftadizim, sefuroksime) etkinliğini agar dilüsyon yöntemi ile araştırmışlar. Son inokulum  $10^5$  CFU/ml yoğunluğunda hazırlanarak, isosensitest agar CM47L plaklarına ekim yapılmış ve 48 saat inkübasyon sonunda en aktif antibiyotiğin, seftizoksime ve seftriakson olduğu saptanmış. En düşük etkinlik aztreonam ile elde edilmiş. .

Garcia Sanchez ve ark. (118), bir çalışmalarında yeni florokinolonların (florokinolon, siprofloksasin, irloksacin, nalidiksik asit ), 62 *B. melitensis*'e karşı etkinliklerini agar dilüsyon yöntemiyle araştırmışlar. Hemoglobun ve isovitaleks içeren MHA plaklarına inokulum  $10^4$ - $10^6$  CFU/ml olacak şekilde ekim yapıp, plaklar %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 35°C'de 48 saat inkübe etmişler. Sonunda, nalidiksik asit hariç tüm florokinolonların yeterli aktivitesi, en aktif florokinolonların, ofloksasin, irloksasin ve siprofloksasin olduğunu saptamışlar. Bunun yanında brusellozun tedavisi için florokinolonların kinetikleri ve lökositlere penetre olma kapasitelerini gözleme imkanı bulmuşlar ve rifampisindeki terapötik yetersizlik, streptomisin toksik etkileri nedeniyle florokinolonların brusellozun tedavisi için bir alternatif olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Doğanay ve ark. (119), bruselloz tedavisinde siprofloksasinin kullarımdaki yerini araştırdıkları bir çalışmada sekiz *B. melitensis* suşuna karşı agar dilüsyon yöntemiyle

siprofloksasinin etkinliğine bakmışlar. MHA plaklarına inokulum  $10^5$  CFU/ml olacak şekilde ekim yapmışlar ve plakları 72 saat sonra değerlendirmişler. MİK değerlerini 4 hastada 0.25 µg/ml, diğer 4 hastada ise 0.125 µg/ml olarak bulmuşlar ve sonuç olarak suşların siprofloksasine duyarlı olduğunu bildirmişler.

Trujillano ve ark. (98), 160 *B. melitensis* suşlarına karşı, sekiz kinolonun (siprofloksasin, ofloksasin, rifampisin, doksisisiklin, streptomisin, levofloksasin, trovafloksasin, sitafloksasin, moksifloksasin, grepafloksasin, gatifloksasin) duyarlılığını agar dilüsyon yöntemi ile araştırmışlar. %1 hemoglobin ve %1 PoliViteX eklenmiş MHA plaklarına yoğunluğu  $10^4$  CFU/ml olacak şekilde ayarlanmış inokulumu ekip inkübe etmişler. İnkübasyon sonunda en etkili antibiyotiğin sitafloksasin olduğunu; siprofloksasin başlangıçta *Brucella* türlerine karşı iyi aktivite gösterdiğini ancak, siprofloksasin ile tedavi sonunda bakterinin bu antibiyotiğe ve diğerlerine çarpaz direnç geliştirdiğini; tek başına siprofloksasinle tedavide relaps oranının yüksek olduğunu; levofloksasin, trovofloksasin, moksifloksasinin aktiviteleri siprofloksasinin aktivitesi ile benzer veya siprofloksasin'nin aktivitesinden daha büyük olduğunu saptamışlar ve bu antibiyotiklerin farmokinetik ve farmodinamik kriterlere bağlı olarak bruselloz tedavisi için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Garcia-Rodriguez ve ark. (88), siprofloksasin, klinafloksasin ve dört yeni florokinolona 120 *B. melitensis* suşunun duyarlılıklarını araştırdıkları bir çalışmada agar dilüsyon yöntemini kullanmışlar. Bu suşları %1 hemoglobin ve %1 PoliViteX içeren MHA plaklarına son inokulum  $10^4$  CFU/ml olacak şekilde ekmişler, antimikrobiallerin iki-kat seri dilüsyonlarını %1 PoliViteX içeren MHB'la hazırlamışlar ve ekim yapılmış plakları 35°C'de %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 48 saat inkübe etmişler. En aktif antibiyotiğin klinafloksasin olduğunu, siprofloksasinin altı kinolon içinde dördüncü sırada etkili olduğunu (MİK<sub>50</sub>: 0.25 µg/ml ve MİK<sub>90</sub>: 0.5 µg/ml) bulmuşlar. Sonuç olarak *B. melitensis* suşlarıyla oluşan brusellozda klinafloksasin ve PD117596, PD131628 florokinolonlarının kullanılabileceğini ancak bu düşüncenin klinik ve laboratuvar çalışmalarıyla desteklenmesi gerektiğini öne sürmüşler.

Ariza ve ark. (110), nüks hızının *B. melitensis*'in in vitro antimikrobiyal duyarlılıklarıyla ilişkisini araştırdıkları bir çalışmada; *B. melitensis* suşlarının tetrasiklin, streptomisin, doksisisiklin ve rifampisinle antimikrobiyal duyarlılıklarını agar dilüsyon yöntemiyle araştırmışlar. Agar dilüsyon yöntemini Iso-Sensitest agar CM47L kültür ortamını kullanmışlar. İnokulumu brain heart infusion broth'la yoğunluğu  $5 \times 10^5$  CFU/ml olacak şekilde hazırlamışlar. İnokulum ekilmiş agar plaklarını 35°C'de 72 saat inkübe etmişler. Tüm suşları test ettikleri bütün antibiyotiklere duyarlı bulmuşlar. Sonuç olarak, in vivo direncin in

vitro antimikrobiyal duyarlılıkla ilişkisini bulamamışlar. Duyarlı olduğu halde nükslerin görülmesini ilacın hücre içindeki konsantrasyonuna ve makrofajların *Brucella* suşlarını eradikasyon kapasitesine bağlı olabileceğini öne sürmüşler.

Yamazhan ve ark. (120), Türkiye’de Ege Bölgesi’nde izole ettikleri *B. melitensis* suşlarına karşı siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, eritromisin, azitromisin, klaritromisin, diritromisin ve doksisisiklinin in vitro aktivitelerini agar dilüsyon metoduyla test etmişler. %1 PoliViteX içeren MHB’la antibiyotiklerin iki kat seri dilüsyonlarını hazırlamışlar ve %1 Hemoglobin ve %1 PoliViteX içeren MHA plaklarına son inokulum  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml olacak şekilde ekim yapmışlar ve plakları 35°C’de normal koşullarda 48 saat inkübe etmişler. En yüksek MİK<sub>50</sub> değerini diritromisin (64 µg/ml), en düşük MİK<sub>50</sub> değerini doksisisiklin (0.25 µg/ml) ve en yüksek MİK<sub>90</sub> değerini diritromisin (64 µg/ml), en düşük MİK<sub>90</sub> değerini doksisisiklinle (0.5 µg/ml) elde etmişler. Önceki çalışmalarla karşılaştırdıklarında doksisisiklin hariç tüm antibiyotikler için daha yüksek MİK değerleri bulduklarını, bunun da sebebinin bölgesel farklılıklara bağlı izolatların duyarlılıklarının farklılık göstermesi olduğunu söylemişler. Kinolon ve makrolidlere karşı oldukça yüksek MİK değerleri saptamalarının nedenini de, Türkiye’de uygunsuz, gereksiz kinolon ve makrolid kullanımına, ayrıca tarım bakanlığı yasaklasa da hayvan yemlerinde bazı makrolidlerin bulunmasına bağlamışlar. Çalışmada test edilen dört makrolidden diritromisinin en az etkin ajan olduğunu buna karşın en etkili antibiyotiğin doksisisiklin olduğunu söylemişler. Sonuç olarak *B. melitensis* suşlarına karşı makrolid ve kinolonlara karşı gittikçe artan bir direncin söz konusu olduğunu iddia etmişlerdir.

Kocagöz ve ark. (77) bir çalışmada, *B. melitensis* suşlarına karşı yeni kinolonların in vitro aktivitelerini agar dilüsyon yöntemiyle tespit etmişler ve eski kinolonlarla karşılaştırmışlar. %1 hemoglobin ve %1 PoliViteX içeren MHA plaklarına  $10^4$ cfu/ml yoğunluğundaki inokulum ekilip inkübe edilmiş. Test ettikleri 69 *B. melitensis* suşuna karşı yedi florokinolonun MİK<sub>90</sub> değerlerine göre en etkilisi sparfloksasin, takiben levoksasin, siprofloksasin, ofloksasin, grepfloksasin, gemifloksasin ve gatifloksasin olarak bulunmuş ve yeni kinolonlarla eski kinolonlara benzer sonuçlar elde edilmiş. Sonuç olarak; bu çalışma ile diğer çalışmalar baz alındığında, yeni kinolonların tek başlarına ve ya rifampisinle kombine kullanımlarının geleneksel tedavi rejimlerinde yerinin olmamasını ancak bu tarz kombinasyonların özellikle doksisisiklin veya streptomisine tolerans gelişmiş vakalarda alternatif olarak kullanılabilceğini öne sürmüşlerdir.



Gür ve ark. (9), brusellozlu hastaların tedavilerinde kullanılan doksisisiklin, azitromisin, ofloksasin, rifampin ve streptomisin'in in vitro aktivitelerini 22 *Brucella* spp. üzerinde E Test ve mikrodilüsyon yöntemi ile araştırmışlar ve bu iki yöntemin sonuçlarını karşılaştırmışlar. Mikrodilüsyon yönteminde %1 PoliViteX içeren MHB' la antibiyotikler iki-kat dilüsyon farkı olacak şekilde sulandırılmışlar. Son inokulum  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml olacak şekilde hazırlanan mikropleytlere  $35^\circ\text{C}$ 'de normal atmosfer koşullarında 48 saat inkübe etmişler. E Test yöntemi de; mikrodilüsyon yöntemine paralel olarak aynı benzer inokulumun %5 koyun kanı eklenmiş MHA plaklarına ekilmesiyle  $35^\circ\text{C}$ 'de normal atmosfer koşullarında 48 saat inkübe edilmesiyle yapılmış. İki metodun MİK değerlerini karşılaştırdıklarında ofloksasin ve streptomisin için %82, rifampisin için %91, azitromisin için %95, doksisisiklin için %100 uyum tespit etmişler. Sonuç olarak E Test sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçları ile %82-%100 arasında uyumlu olduğunu bu nedenle E Testin *Brucella* spp.'lerinin antibiyotik duyarlılıklarının test edilmesinde kolay uygulanabilir olması, yoğun emek ve zaman gerektirmemesi sebebiyle kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Akova ve ark. (76) 1999 yılında, broth dilüsyon yöntemi ile ofloksasin, siprofloksasin, doksisisiklin, streptomisin, rifampin, azitromisin ve eritromisin'in in vitro etkinliği pH:7 ve pH:5'de tespit edip karşılaştırılmışlar. İnokulum  $10^5$  ila  $10^6$  CFU/ml arası bir değerde hazırlanmış ve %1 PoliViteX içeren MHB'a ekim yapılmış.  $35^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyondan sonra eritromisin hariç diğer antibiyotiklerin pH:7'de, 42 *B. melitensis*'e karşı aktivitesinin iyi olduğunu, izolatların %90'ının (MİK<sub>90</sub>), CLSI'de önerilen değerler arasında inhibe edildiğini saptamışlar. Rifampisin'in aktivitesi pH:5'de 2 ila 8 kat arasında artarken, ofloksasin, siprofloksasin, eritromisin, streptomisin ve azitromisin'in aktivitesinin oldukça azaldığını gözlemlemişler. Sonuç olarak; florokinolonların, streptomisin'in ve azitromisin'in pH:7'de *B. melitensis*'e karşı iyi aktivite gösterdiğini, pH:5'de aktivitesini kaybettiğini; rifampisin'in MİK değerinin pH:5'de arttığını, doksisisiklinin pH:5'de aktivitesinin sadece iki kat azaldığını; dolayısı ile rifampin ve doksisisiklinin pH:5'de aktivitesini koruduğunu saptamışlar. Yine bu çalışmada *B. melitensis*'e karşı pH:5'de en etkili antibiyotiğin rifampin, pH:7'e ise doksisisiklin olduğunu, ancak doksisisiklinin pH:5'de de etkinliğini koruduğu göstermişler. Ayrıca bu çalışmada, antibiyotik kombinasyonlarının aktivitelerini test etmişler ve pH farklılığını gözardı ederek, azitromisin-rifampin ve ofloksasin-rifampin kombinasyonlarının streptomisin-doksisisiklin ve rifampin-doksisisiklin kombinasyonlarından daha az sinerji gösterdiğini saptamışlar. Araştırmacılar gözlenen in vitro antogonizme rağmen ofloksasin-rifampin

kombinasyonu ile bruselloz tedavisinin rifampin-doksisiklin kombinasyonuna göre daha başarılı olduğunu öne sürmüşler.

Hussan ve ark. (86), 146 *B. melitensis* suşuna karşı dört florokinolon grubu antibiyotiğin (siprofloksasin, fleroksacin, pefloksacin, norfloksacin) ve tetrasiklin, gentamisin, trimetoprim-sulfamethoxazol ve rifampinin in vitro aktivitelerini broth dilüsyon yöntemi ile tespit edip sonuçları karşılaştırmışlar. 35°C'de CO<sub>2</sub>'li ortamda 48 saatlik inkübasyon sonunda, siprofloksasin, fleroksacin, pefloksacin, norfloksacin, gentamisin ve tetrasiklinin, izolatların hepsini 0.5 ml/l konsantrasyonda, rifampisin ve trimetoprim-sülfamethoksazol ise 1 mg/ml konsantrasyonda inhibe ettiğini saptamışlar. Sadece siprofloksasin ile tedavi sonrasında relaps görülen bir hastadan tekrar izole edilen kökünde direnç geliştiğini, MİK değerinin 0.06 mg/l'den 5 mg/l'ye yükseldiğini ve diğer kinolonlara da çapraz direnç geliştirdiğini gözlemlemişler.

Khan ve ark. (121), 47 *B. melitensis* suşuna karşı üç florokinolon grubu antibiyotiğin (ofloksasin, difloksasin ve siprofloksasin) ve trimetoprim-sulfametoksazol, streptomisin, tetrasiklin ve rifampisinin in vitro aktivitelerini broth dilüsyon yöntemi ile tespit etmişler. Son inokulum 10<sup>5</sup> CFU/ml olacak şekilde mikropleytlere ekim yapılmış ve 35-37°C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiş. Bu mikropleytlere inhibisyon miktarını saptamak için her gün değerlendirilmiş. Brusellozun tedavisi için günümüzde kullanılan dört antimikrobiyal ajan (trimetoprim-sulfametoksazol, streptomisin, tetrasiklin ve rifampisin) ile üç florokinolon grubu antibiyotiğin MİK değerleri karşılaştırıldığında en etkili antibiyotiğin ofloksasin (MİK<sub>90</sub>: 0.02µg/ml), en az etkili olanın da trimetoprim-sulfametoksazol (MİK<sub>90</sub>: 5µg/ml) olduğunu saptamışlar. Florokinolonlar arasında da ofloksasinin, difloksasin ve siprofloksasinden daha etkili olduğunu tespit etmişler.

Rubinstein ve ark. (87), 86 *B. melitensis* suşuna karşı minosiklin, streptomisin, rifampisin, trimetoprim-sulfamethoxazol ve altı florokinolon grubu antibiyotiğin (pefloksasin, ofloksasin, siprofloksasin, feroksasin, sparfloksasin, WIN 57273) etkinliğini broth dilüsyon ve agar dilüsyon yöntemi ile tespit etmişler. Broth dilüsyon yönteminde, antibiyotikleri *Brucella* broth'la sulandırmışlar ve 10<sup>5</sup> CFU/ml yoğunluktaki inokulumu ekip, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 48 saat inkübe etmişler. Agar dilüsyon yönteminde ise; 10<sup>4</sup> ile 10<sup>5</sup> CFU/ml arasında olan inokulumu *brucella* agar plaklarına ekip, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 48 saat inkübe etmişler. En etkili antibiyotiğin minosiklin olduğunu ve en az etkili antibiyotiğin ise trimetoprim-sulfametoksazol olduğunu, florokinolonlar arasında ise en etkili antibiyotiklerin WIN 57273 ve siprofloksasin olduğunu ve en az aktif florokinolonların ise

fleroksasin olduğunu tespit etmişler. Çalışmada seçilen 15 izolata karşı antibiyotik kombinasyonun hiçbirinin sinerji göstermediğini; yapılan öldürme oranı (“killing rate”) çalışmalarında, minosiklin, rifampisin, siprofloksasinin tam öldürme zamanının 48 saate uzadığını, streptomisinin en hızlı öldürmeyi (<12 saat) gösterdiğini ve ayrıca streptomisin minosiklin, rifampisin, siprofloksasin ile kombinasyonlarının (2 saat içinde) en hızlı öldürme zamanını (“killing time”) gösterdiğini, diğer kombinasyonların öldürme zamanının 96 saate kadar uzadığını rapor etmişler. Sonuç olarak, çeşitli in vitro yöntemler kullanarak *B. melitensis*'in antibiyotik duyarlılığını değerlendirdiklerinde sonuçların uyumsuz olduğunu göstermişler. Örneğin, minosiklin antibiyotik duyarlılık çalışmalarında en etkili antibiyotikken bu antibiyotiğin hızlı öldürmediğini tespit etmişler. Bu çalışmaya göre bir florokinolonun streptomisinle kombinasyonu daha fazla etkili olurken bir florokinolonun tetrasiklinle kombinasyonunun engellenmesi gerektiğini öne sürmüşler.

Kinsara ve ark. (122), *Brucella* türlerinin Co-trimoksazole artan dirençlerini araştırdıkları bir çalışmada; co-trimoksazol, tetrasiklin, rifampisin, gentamisin ve siprofloksasine 37 *B. melitensis* izolatının antimikrobiyal duyarlılığını Kirby Bauer disk difüzyon tekniği ile test etmişler. Bir izolat dışında tüm izolatlar tetrasiklin, rifampisin, gentamisin ve siprofloksasine; izolatların %38'i de co-trimoksazol duyarlı bulunmuş. Kinsara ve arkadaşları bu çalışmanın sonucunda tetrasiklin ve siprofloksasin kombinasyonunun tedavide kullanılmasının doğru olacağını, birçok bakterinin bruselloz tedavisinde kullanılan geleneksel ilaçlara dirençli olmasından dolayı bu ilaçların *Brucella* türlerine karşı da duyarlı olmasının garanti edilemeyeceğini, araştırmacıların bölgesel *B. melitensis*'in duyarlılık paternini saptamaları gerektiğini ancak brusellozun serolojik tanısına fazla güven duymamalarını öne sürmüşlerdir. Eşel ve ark. (8), yaptıkları ön çalışmalarda bu çalışmaya atfen zon çaplarının çok büyük olması ve disk difüzyonla dilüsyon yöntemleri arasında uyum bulunmaması nedeniyle, *Brucella* suşlarında disk difüzyon yöntemiyle duyarlılık çalışılmasının doğru olmadığını belirtmişlerdir.

Dünyanın birçok bölgesinde ve Türkiye’de yapılan bu araştırmaları bizim çalışmamızla karşılaştırdığımızda; Türkiye’de insanlarda hastalık etkeni olarak izole edilen türlerin büyük çoğunluğunun en virülan tür olan *B. melitensis* olduğunu gördük (11,48,76,104,111,112,119). Şimşek ve ark. (48,) insan kaynaklı *Brucella* izolatlarının tip-biyotiplerini tespit ederek sonuçları epidemiyolojik olarak irdeledikleri çalışmalarında, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi’nde izlenen 70 bruselloz olgusundan 65’inin (%92.8) *B. melitensis*, 5’inin ise (%7.2) *B. abortus* olduğunu; Baykam ve arkadaşları (114) Ankara Numune Eğitim ve

Araştırma Hastanesi'nde yatan 42 brusellozlu hastadan 37'sinin *B. melitensis*, 5'inin ise *B. abortus* olduğunu; Kuloğlu ve arkadaşları (123) Trakya Bölgesi'nden hastalık etkeni olarak izole edilen 49 kökenin 48'inin *B. melitensis*, 1'inin ise *B. abortus* olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde *B. canis* ile ilgili veri azdır, *B. suis*'e bağlı olguya rastlanmamıştır. Diğer endemik ülkelerde de örneğin İtalya (14), Yunanistan, Kıbrıs ve Suriye'de (10) yapılan çalışmalarda da en çok *B. melitensis* izolatu rapor edilmektedir. Daha az görüldüğü ülkelerde de olguların çoğunun *B. abortus* ya da *B. suis* kaynaklı olduğu bildirilmektedir (29,104). Trakya Bölgesi hatta tüm Türkiye'de küçükbaş hayvancılığın büyükbaş hayvancılıktan daha fazla olması *B. melitensis* infeksiyonunun daha sık olmasını açıklamaktadır.

*Brucella*'nın izole edilmesi ve idantifikasyonunun yanısıra biyotiplendirilmesi, epidemiyolojik çalışmalar ve eradikasyon programları açısından büyük önem taşımaktadır. *Brucella* suşlarının tür ve biyotip tayininde DSÖ'nün önerdiği standart yöntemler, biyokimyasal özellikler (CO<sub>2</sub>'e gereksinim, H<sub>2</sub>S üretimi), boyalara (tiyoin ve bazik fuksin) duyarlılık, Tbilisi fajı ile lizisin değerlendirilmesi ve A-M monospesifik antiserumları ile aglütinasyondur. Örneğin İtalya'da en yaygın olarak *B. melitensis* biyotip 1, Suriye'de ise her üç tipin de var olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (48). Bizim çalışmamızda bu standart yöntemlere göre, Türkiye'de yapılan diğer çalışmalara (11,112-114) benzer şekilde sonuçlar elde etmiş olup; çalışmamıza aldığımız 43 *Brucella* izolatının 42'sinin *B. melitensis* biyotip 3, 1'nin ise *B. melitensis* biyotip 1 olduğunu saptadık.

Sonuç olarak bölgemizde insan brusellozunda en önemli etkenin *B. melitensis* ve en yaygın suşun *B. melitensis* biyotip 3 olduğunu gördük. Bizim çalışmamızın esas amacı farklı olsa da bu verilerin bölgemizde ve ülke genelinde epidemiyolojik veri kaynağı olarak kullanılabilceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda kullandığımız standart kökenlerin MİK değerleri, tüm antibiyotikler için CLSI'de önerilen değerler arasında bulundu (100). MİK değerlerinin yorumlanmasında ve duyarlılık durumlarının tespitinde; CLSI'nın siprofloksasin ve rifampisin için *Haemophilus* türleri için belirlediği MİK yorumlama standartları sınır değerler olarak kullanılırken, streptomisin ve doksisisiklin için biyoterörizmin olası etkenleri için MİK yorumlama standartları sınır değerler olarak kullanıldı. Ayrıca *B. melitensis* M16 ve *B. melitensis* Ether kökenlerinin MİK değerleri de saptandı ve her 2'si de tüm antibiyotiklerimize duyarlı bulundu.

Tetrasiklin analogu olan doksisisiklin; iyi bir farmakokinetiğe, lipofilik yeteneğe ve biyoyararlanıma sahip olduğundan bruselloz tedavisinde tercih edilmektedir (11) ve bruselloz

tedavisinde kullanılan antimikrobiyaller arasında en düşük MİK<sub>90</sub> değerine sahip olandır (8,11,112-114,117,120).

Çalışmamızda doksisisiklin için; her iki yöntemle en düşük MİK<sub>90</sub> değerlerini saptarken, Türkiye’de (8,107,112,114) ve dünyanın çeşitli bölgelerinde (14,98,110) yapılan diğer çalışmalardaki sonuçlara benzer MİK değerleri elde ettik. Çalışmamızda MİK<sub>90</sub> değerleri 48 saat inkübasyon sonunda agar dilüsyon ve E Test yönteminde aynı saptanırken, 72 saat inkübasyondan sonra agar dilüsyon MİK<sub>90</sub> değerinin E Test MİK<sub>90</sub> değerinden 1 kat dilüsyon yüksek olduğu saptandı. Eşel ve ark. (8) agar dilüsyon ve E Test yöntemini, Gür ve ark. (9) broth mikrodilüsyon ve E Test yöntemini karşılaştırdıkları her iki çalışmada doksisisiklin için 48 saatlik inkübasyon sonunda anlamlı bir farklılık bulunmazken, Akova ve ark. (76) broth mikrodilüsyon yönteminde, Yamazhan ve ark. (120) agar dilüsyon yönteminde E Test yöntemine göre daha yüksek MİK değerleri saptamışlardır. Çalışmamızda 72 saat inkübasyon sonunda her iki yöntemle doksisisiklin için elde ettiğimiz MİK değerleri, Ariza ve ark.’nın (110) ve Bosch ve ark.’nın (111) agar dilüsyonla elde ettikleri MİK değerlerine benzer bulundu. Gür ve ark. (9) MİK değerleri mukayese edildiğinde broth mikrodilüsyon ve E Test yöntemini uyumlu bulurken, bizim çalışmamızda Eşel ve ark.’nın (8) çalışmalarında olduğu gibi MİK değerleri açısından agar dilüsyon ve E Test yöntemi arasında ilişki bulamadık.

Doksisisiklin için MİK değerleri yorumlandığında tüm izolatlar diğer çalışmalarda olduğu gibi hem agar dilüsyon (8,14,98,110,120) hem de E Test yönteminde(9,11,12,107,113,114) doksisisikline duyarlı bulundu. Eşel ve ark. (8) agar dilüsyon ve E Test yöntemini, Gür ve ark. (9) broth mikrodilüsyon ve E Test yöntemini karşılaştırdıkları her iki çalışmada da yorumlama kategorisine göre bizim çalışmamızda olduğu gibi doksisisiklin için testler arasında %100 uyum saptamışlar. Bizim çalışmamızda ayrıca 72 saat inkübasyon sonunda doksisisiklin test edildiğinde her iki yöntemle bütün izolatların duyarlı olduğunu saptadık ve her iki testin duyarlılık açısından uyumunu %100 bulduk.

Çalışmamızda streptomisin için; her iki yöntemimizle 48 saat inkübasyon sonunda Turkmani ve ark.’nın(10), Kaya-Fırat ve ark.’nın(116) E Test, Akova ve ark.’nın(76) broth mikrodilüsyon, Khan ve ark.’nın broth mikrodilüsyon yönteminde elde ettikleri sonuçlara benzer MİK değerleri elde ettik. Kılıç ve ark.’nın (109), Ayaşlıoğlu ve ark.’nın (11) ve Eşel ve ark.’nın (8) E Test yöntemi, yine Eşel ve ark.’nın agar yöntemi ile tespit ettikleri MİK değerlerinden daha yüksek sonuçlar elde ederken, Trujillano-Martin ve ark.’nın (98) agar dilüsyon yöntemi ile tespit ettikleri MİK değerlerinden daha düşük sonuçlar elde ettik. ise Ariza ve ark.’nın (110) ve Bosch ve ark.’nın (111) 72 saat inkübasyon sonunda agar dilüsyon

yöntemi ile elde ettiği MİK değerlerinden daha yüksek değerler tespit ettik. Gür ve ark. (9) MİK değerleri mukayese edildiğinde broth mikrodilüsyon ve E Test yöntemini %82 uyumlu bulurken, biz de çalışmamızda 48 saat inkübasyon sonunda agar dilüsyon ve E Test arasında anlamlı ilişki bulduk, ancak 72 saat inkübasyonda ilişki bulamadık. Eşel ve ark. (8) çalışmalarında MİK değerleri açısından agar dilüsyon ve E Test yöntemi arasında uyum bulamazken, Rubinstein ve ark. (87) agar dilüsyon ve broth dilüsyon yöntemleri arasında anlamlı fark bulamamışlar.

Streptomisin için MİK değerleri yorumlandığında tüm izolatlar diğer çalışmalarda olduğu gibi hem agar dilüsyon (8,76,110,111) hem de E Test yönteminde (8-11,116) streptomisine duyarlı bulundu. Eşel ve ark. (8) agar dilüsyon ve E Test yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada yorumlama kategorisine göre bizim çalışmamızda olduğu gibi streptomisin için testler arasında %100 uyum saptamışlar. Çalışmamızda ayrıca 72 saat inkübasyon sonunda streptomisin test edildiğinde her iki yöntemle bütün izolatların duyarlı olduğunu saptadık ve her iki testin duyarlılık açısından uyumunu %100 bulduk.

Çalışmamızda siprofloksasin *B. melitensis* suşlarına karşı doksisiklin kadar etkili bulunmuştur. Siprofloksasin için; E Test yöntemi (8,10-12,14,107,109,112-114), agar dilüsyon yöntemi (77,88,90,118) ve broth dilüsyon yöntemi (86) ile yapılan çalışmalara benzer sonuçlar elde ettik. Ancak Trujillano-Martin ve ark.'nın (98) ve Yamazhan ve ark.'nın (120) agar dilüsyon yöntemi, Akova ve ark.'nın (76) broth mikrodilüsyon, Khan ve ark.'nın (121) broth yönteminde elde ettikleri sonuçlardan anlamlı derecede düşük bulduk. Her iki testimizle 72 saat inkübasyon sonunda ise Bosch ve ark.'nın (111) ve Doğanay ve ark.'nın (119) agar dilüsyon yöntemiyle elde ettikleri sonuçlara benzer sonuçlar elde ettik. Çalışmamızda Eşel ve ark.'nın (8) çalışmalarında olduğu gibi MİK değerleri açısından agar dilüsyon ve E Test yöntemi arasında ilişki bulamadık. Rubinstein ve ark. (87) ise agar dilüsyon ve broth dilüsyon yöntemleri arasında anlamlı fark bulamamışlar.

Siprofloksasin için MİK değerleri yorumlandığında tüm izolatlar; agar dilüsyon (8,77,88,90,111,118,119), E Test (8,10-12,14,107,109,112-114), broth mikrodilüsyon (76) ve broth dilüsyon yöntemi (121) ile duyarlılığı tespit edilmiş diğer çalışmalarda olduğu gibi siprofloksasine duyarlı bulundu. Eşel ve ark. (8) agar dilüsyon ve E Test yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada yorumlama kategorisine göre bizim çalışmamızda olduğu gibi siprofloksasin için testler arasında %100 uyum saptamışlar. Bizim çalışmamızda ayrıca 72 saat inkübasyon sonunda Bosch ve ark.'nın (111) ve Doğanay ve ark.'nın (119)

çalışmalarında olduğu gibi siprofloksasin test edildiğinde her iki yöntemle bütün izolatların duyarlı olduğunu saptadık ve her iki testin duyarlılık açısından uyumunu %100 bulduk.

Rifampisin MİK değerleri E Test (8,10-12,14,107,109,112-114,116), agar dilüsyon (98), broth dilüsyon (86,121) ve broth mikrodilüsyon (76) yöntemleriyle yapılmış diğer çalışmalara benzer MİK aralığında tespit edildi. Bizim çalışmamızda 72 saat inkübasyondan sonra saptanan MİK değerleri de diğer çalışmalardakine (110,111) benzer MİK aralığında tespit edildi. Rifampisinin MİK değerleri 0.5-2 µg/ml arasında değişmektedir. Çalışmamızda 48 saat inkübasyon sonunda Eşel ve ark.'nın (8) çalışmasındaki sonuçlara benzer olarak agar dilüsyon yöntemi ile 43 izolatımızın 35'ini (%81)  $\geq 1\mu\text{g/ml}$  altında bulurken, E Test yöntemi ile 43 izolatımızın tümünü (%100)  $\geq 1\mu\text{g/ml}$ 'nin altında bulduk. Gür ve ark. (9) MİK değerleri mukayese edildiğinde; broth mikrodilüsyon ve E Test yöntemini %91 uyumlu bulurken, biz de çalışmamızda 48 saat inkübasyon sonunda agar dilüsyon ve E Test arasında anlamlı ilişki bulduk, ancak 72 saat inkübasyonda ilişki bulamadık. Eşel ve ark. (8) çalışmalarında MİK değerleri açısından agar dilüsyon ve E Test yöntemi arasında uyum bulamazken, Rubinstein ve ark. (87) agar dilüsyon ve broth dilüsyon yöntemleri arasında anlamlı fark bulamamışlar.

Çalışmamızda hiçbir izolat her iki test yönteminde de rifampisine dirençli bulunmamıştır. Ancak 48 saat inkübasyon sonunda Eşel ve ark.'nın (8) çalışmasında olduğu gibi agar dilüsyonla 43 suşun 8'i orta derecede duyarlı bulunan izolatlar E Test yöntemi kullanıldığında duyarlı bulunmuştur. Baykam ve ark. (114) E Test yöntemiyle test edilen 33 *B. melitensis* suşunun 4'ünü, Turan ve ark. (107) 82 suşun 19'unu rifampisine orta derecede duyarlı bulurken; Köse ve ark. (113) ise E Test yöntemiyle 11 suşun tamamını duyarlı bulmuşlardır. Çalışmamızda 72 saat inkübasyon sonunda 43 suşun 41'ini orta derecede duyarlı olarak saptarken E Testler arasında uyumlu sonuç elde edemedik. Ayrıca 72 saatlik inkübasyon göz önüne alındığında, Ariza ve ark. (110) agar dilüsyonla yaptıkları çalışmada rifampisine dirençli suş saptayamamışken, Bosch ve ark. (111) agar dilüsyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada dirençli suşlar saptamışlardır. Çalışmamızda test ettiğimiz diğer antimikrobiyallerin her iki testle duyarlılık durumlarını %100 uyumlu bulurken, rifampisinle bu uyum %83 olarak saptandı.

Çalışmamızda test ettiğimiz doksisiklin, streptomisin, siprofloksasin ve rifampisin antimikrobiyallerine karşı Türkiye'den bildirilen diğer çalışmalarda olduğu gibi direnç saptanmamıştır. Ancak rifampisine (14,111), siprofloksasine (86,120) ve çalışmamızda test etmediğimiz makrolidlere (120) ve trimetoprim-sulfometoksazol'e karşı artan direnci bildiren

(114,122) çalışmalar mevcuttur. Buna karşın Ariza ve ark. (110) in vivo direncin in vitro etkinlikle ilişkisini bulamamışlar.

Bruselloz tedavisinde tedavi başarısızlığı, nükslerin artması ve mevcut kullanılan geleneksel ilaçların kullanım zorluğu ve yan etkileri gibi nedenler yeni antimikrobiyallerin denenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu nedenle tetrasiklin analogu olan tigesiklin (107,115), yeni kuşak kinolonlar (77,86-88,90,98), makrolidler (9,11,12,76,120) ve sefalosporinlerin (8,94,112,113) kullanımına ilişkin in vitro çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalardan bazılarında antimikrobiyallerin tek tek kullanımından çok kombine tedavideki etkinliklerinin saptanması amaçlanmış, buna yönelik testler yapılmış ve sonuçları yayınlanmıştır (12,87,109,116). Araştırmacılar kombinasyon tedavisinde en etkili rejimin rifampisin+tetrasiklin kombinasyonu olduğunu (12,116), florokinolon+tetrasiklin kombinasyonunun kullanılabilirliğini (122) ve florokinolon+tetrasiklin kombinasyonunun kullanılmaması gerektiğini (87) bildirmişlerdir.

Türkiye’de ve dünyanın çeşitli bölgelerinde yayınlanan bu çalışmalardaki bulgularla bizim çalışmamızda saptadığımız bulguları karşılaştırdığımızda;

Doksisiklin hala en etkili ajanlardan biridir. İyi bir farmakokinetiğe, lipofilik yeteneğe ve biyoyaralanıma sahip olduğundan tetrasiklin analogu olarak tercih edilmektedir (11). Çalışmamızda en düşük MİK değerleri doksisiklinle elde edilmiştir.

Bruselloz tedavisinde yaygın kullanılmasına karşın Streptomisin; tedavide etkili olsa da parenteral kullanım zorluğu, ototoksik ve nefrotoksik yan etkilerinin varlığı alternatif tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (11). Çalışmamızda streptomisinin MİK değerleri daha önceki çalışmalarda belirlenen MİK değerleri arasında bulunmuştur ancak Trujillano ve ark.’nın (98) çalışmalarında tespit ettikleri MİK değerlerinden daha düşük sonuçlar tespit edilmiştir.

Kinolonların in vitro etkinliği iyi olsa da in vivo etkinlikleri tartışmalıdır (10). Bizim çalışmamıza göre siprofloksasin *B. melitensis* suşlarına karşı doksisiklin kadar etkili bulunmuştur. Kinolonlarla tedavide relaps oranlarının yüksek olması (8,119) ve kinolonların asidik pH’da aktivitelerinin azalması (76) nedeniyle monoterapide kullanılmaları sakıncalıdır. Kinolonların kombinasyon rejimlerinde kullanılmasına dair çalışmalar da mevcuttur (87,122). İn vitro çalışmalarda diğer klasik kombinasyon rejimlerine eşit bir etkinlik görülmesine rağmen günümüzde yayınlanmış randomize klinik çalışmalar kinolon kombinasyonlarını ilk tercih olarak desteklememektedir (11). Rifampisinle kombine kullanılmaması ancak



doksisiklin veya streptomisine tolerans gelişmiş vakalarda alternatif olarak kullanılması uygundur (77).

Rifampisin toksik etkileri olmasına karşınoral uygulanım kolaylığına sahiptir. Çalışmamızda hiçbir izolat rifampisine dirençli bulunmamıştır. Rifampisin tüberküloz için kullanılması gereksinimi ve özellikle vakalarda alternatif ilaç tedavisi gereksinimi, başka antimikrobiklerin kullanılmasının araştırılmasına yol açmıştır. Buna bağlı olarak *Brucella* suşları için antibiyotik duyarlılık testi; özel vakalarda, epidemiyolojik araştırmalarda ve potansiyel tehlikelerin varlığında seçilecek tedavinin belirlenmesine yardımcı olabilir. Bu nedenle *Brucella* antimikrobiyal duyarlılık testi için basit, ucuz ve duyarlı bir yöntemin bulunması, oluşabilecek herhangi bir ilaç direncinin erken belirlenmesinde faydalı olabilir (10).

Sonuç olarak *Brucella* duyarlılık testleri rutin olarak uygulanmamakta ve ek olarak CLSI'nın bu mikroorganizmalar için önerdiği standart bir duyarlılık testi bulunmamaktadır. *Brucella*'nın in vitro duyarlılıklarına ilişkin az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda çeşitli yöntemler denenmiştir. Broth dilüsyon, agar dilüsyon, E Test ve disk diffüzyon yöntemi antimikrobiklerin MİK değerlerinin tespiti için uygulanmıştır.

Disk diffüzyon yönteminde zon çaplarının büyük olması ve disk diffüzyon yöntemi ile dilüsyon yöntemleri arasında uyum bulunamaması nedeniyle *Brucella* suşlarının duyarlılık çalışması için bu yöntem önerilmemektedir (8,122).

Broth dilüsyon yöntemiyle yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar agar dilüsyon yöntemi ile uyumlu olsa da (9,87) dilüsyon yöntemlerine göre daha kısa zamanda ve kolay uygulanabilir bir yöntem olan E Test yöntemi *Brucella* suşlarının duyarlılık paternlerinin araştırılmasında tercih edilen bir yöntemdir (10-12,14,77,107,109,112-116,119,120). E Test yöntemi ile ilgili sorun standardize olmamasıdır. Türkiye'deki araştırmacıların çoğu E Test yöntemini kullanmış ve birbirlerine benzer sonuçlar bildirmişler ve E Test yönteminin daha güvenilir ve pratik olduğunu savunmuşlardır. E Test yöntemini broth mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştıran Gür ve ark. (9) MİK değerlerinde anlamlı bir farklılık saptamamışlar. Aksine Akova ve ark. (76) mikrodilüsyonla, Yamazhan ve ark. (120) agar dilüsyonla yaptıkları çalışmalarında E Test yöntemine göre daha yüksek MİK değerleri saptamışlardır.

Çalışmalarda *Brucella* agar, MHB, MHA (eksiz veya %1 PoliViteX 'le güçlendirilmiş veya %1 PoliViteX + %1 hemogloblin'le veya %1 PoliViteX + %5 koyun kanı ilave edilmiş) kültür ortamları kullanılmaktadır. Birçok çalışmada farklı yöntemler, kültür ortamları, inokulum yoğunluğu (  $10^3$ - $10^6$  arasında değişen), atmosfer şartları (normal atmosferik hava

veya %5- 10 CO<sub>2</sub>'li ortam), pH'lar (pH:5 veya pH:7) ve inkübasyon süreleri uygulanmıştır. Bu farklılıkların MİK değerlerini etkilediğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Garcia-Rodriguez ve arkadaşları (90) çalışmalarında test koşullarındaki değişikliklerin orta derecede etkili olduğunu, pH:5 ve pH:7'de inokulum yoğunluğundaki artışların antibiyotiklerin aktivitesi üzerine belirgin etkisi olmadığını, pH değişikliklerinin bazı antibiyotiklerin aktivitelerinde değişikliğe sebep olduğunu bildirmişlerdir. Akova ve ark. (76) pH değişikliklerinin bazı antibiyotiklerin aktivitelerinde değişikliğe sebep olduğunu saptamışlardır. Gür ve ark. (9) pH, inokulum ve kültür ortamının farklılığının sonuçları etkileyebileceğini söylemişlerdir. Marianelli ve ark. (14) her iki kültür ortamında anlamlı farklılıklar olmadığı halde inhibisyon zonunun net görülmesinden ve MİK kalibresini belirten striplerin daha kolay okunabilir olmasından dolayı MHA kültür ortamının tercih edilmesi gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızla diğer çalışmalar ve çalışmamızdaki agar dilüsyon ve E Test yöntemi arasındaki farklılıklar; kültür ortamı, inokulum, atmosferik koşullar ve kullanılan yöntemlerin farklılığından ve de *Brucella* suşlarının bölgesel değişiklik göstermesinden kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda MİK değerleri göz önüne alındığında; sadece streptomisin ve rifampisin test edildiğinde agar dilüsyon yöntemi ile E Test yöntemi arasında uyum bulundu. Duyarlılık paterni göz önüne alındığında ise; doksisiklin, streptomisin ve siprofloksasin test edildiğinde %100, rifampisin test edildiğinde %83 uyum bulundu. Benzer şekilde Eşel ve ark. (8) da sadece rifampisin için E Test ile agar dilüsyon yöntemi arasında uyum saptamışlardır. Bu nedenle E Test yönteminin *B. melitensis* suşlarının MİK değerlerinin ve duyarlılık durumlarının tespitinde kullanımının sınırlı olduğunu söylemişlerdir. Ancak her iki test yönteminde MİK değerlerinin saptanmasında rakamsal farklılıkların oluşu ölçüm kalibrasyonlarının farklılığına dayanmaktadır. Örneğin; agar dilüsyon yönteminde 0.03- 0.06- 0.125- 0.25 dilüsyon katları mevcutken E Test yönteminde bu dilüsyon katları 0.023- 0.032- 0.047- 0.064- 0.94- 0.125- 0.19- 0.25 şeklindedir. Agar dilüsyon yöntemi ile E Test yöntemi mukayese edilirken E Test yönteminde tespit edilen değer; agar dilüsyondaki iki değer arasına denk geliyorsa, bu iki değer büyük olan değerine yuvarlanarak rapor edilmektedir. Örneğin; E Test yönteminde 0.032 µg/ml olarak saptanan değer 0.06 µg/ml olarak rapor edilmektedir. Çalışmamızda agar dilüsyon yöntemi ile 0.03 µg/ml olarak saptanan MİK değeri E Test yöntemiyle 0.032 µg/ml saptanmasına rağmen 0.06 µg/ml olarak rapor edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda MİK değerleri paterni göz önüne alındığında, rakamsal açıdan farklılıkların oluşu her iki yöntem arasındaki uyumu sınırlı bulmamıza

neden olmuştur. Duyarlılık paterni göz önüne alındığında ise; bu uyumun %100'lere vardığı saptanmıştır. Bu saptamalar ışığında *Brucella* izolatları test edildiğinde E Test yönteminin kolay uygulanabilir, basit, fazla zaman ve emek gerektirmeyen bir yöntem olması ve zon çaplarının net olarak görülebilmesinden dolayı MİK değerlerinin ve buna bağlı olarak duyarlılık paternlerinin doğru olarak saptanabilmesi nedeniyle tercih edilebileceğini düşünüyoruz. Ancak biz çalışmamızda dört antimikrobiyal test ettik. Bruselloz tedavisinde kullanılan diğer antimikrobiyallerin de bu iki yöntemle karşılaştırılmalı olarak test edilmesi gerekliliğini göz ardı edemeyiz. Bu nedenle *Brucella*'ların antimikrobiyal duyarlılığının saptanmasında standardizasyon oluşturmak için bizim çalışmamıza benzer ve daha kapsamlı birçok çalışmanın yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

## SONUÇLAR

TÜTF Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ocak 2002-Aralık 2004 tarihleri arasında hastalardan alınan 41 adet kan kültürü ve 2 adet eklem sıvısı örneğinden, standart metotlarla izole edilen ve *Brucella* olarak adlandırılan 43 suş çalışmaya alındı. İzole edilen suşlardan 42'si *B. melitensis* biyotip 3, 1'i *B. melitensis* biyotip 1 olarak adlandırıldı. Bu suşların in vitro olarak doksisisiklin, streptomisin, siprofloksasin ve rifampine duyarlılıkları agar dilüsyon referans yöntemi ve E Test yöntemi ile araştırılarak, 48 ve 72 saat sürenin sonunda CLSI agar dilüsyon referans yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda bakteri inokulum yoğunluğunu  $10^4$  CFU/ml olacak şekilde hazırladık. Agar dilüsyon ve E Test yöntemi ile hazırladığımız MHA plaklarını 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda değerlendirdik.

Agar dilüsyon ve E Test yöntemiyle doksisisiklin test edildiğinde; bütün izolatlarımızın MİK değerlerini 48 ve 72 saat sonunda CLSI'nın sınır değerleri arasında bulduk. MİK değerleri karşılaştırıldığında; doksisisiklinin 48 ve 72 saatlik inkübasyonda agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 arasında değerler açısından ilişki bulamadık. E Test-1 ve E Test-2 arasında ise değerler açısından ilişki olduğunu gördük. Yorumlama kategorisine göre değerlendirdiğimizde; agar dilüsyon ve E Test yöntemi ile 43 suşun 48 ve 72 saatlik inkübasyonda doksisisikline duyarlı olduğunu tespit ettik (%100). Doksisisiklin için yorumlama kategorisini istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde agar dilüsyonla E Test arasındaki uyumu %100 bulduk.

Agar dilüsyon ve E Test yöntemiyle streptomisin test edildiğinde; bütün izolatlarımızın MİK değerlerini 48 ve 72 saat sonunda CLSI'nın sınır değerleri arasında bulduk. MİK değerleri karşılaştırıldığında; streptomisinin 48 saat inkübasyonda agar dilüsyonla E Test-1,

agar dilüsyonla E Test-2 arasında ve E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından anlamlı ilişki bulunurken, 72 saat sonunda ise; agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 arasında ve E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından ilişki bulunmadık. Yorumlama kategorisine göre değerlendirdiğimizde; agar dilüsyon ve E Test yöntemi ile 43 suşun 48 ve 72 saatlik inkübasyonda streptomisine duyarlı olduğunu tespit ettik (%100). Streptomisin için yorumlama kategorisini istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde agar dilüsyonla E Test arasındaki uyumu %100 bulduk.

Agar dilüsyon ve E Test yöntemiyle siprofloksasin test edildiğinde; bütün izolatlarımızın MİK değerlerini 48 ve 72 saat sonunda CLSI'nın sınır değerleri arasında bulduk. MİK değerleri karşılaştırıldığında; streptomisinin 48 saat inkübasyonda agar dilüsyonla Siprofloksasinin 48 ve 72 saat inkübasyonda MİK değerleri karşılaştırıldığında agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 arasında ve E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından ilişki bulunmadı. Yorumlama kategorisine göre değerlendirdiğimizde; agar dilüsyon ve E Test yöntemi ile 43 suşun 48 ve 72 saatlik inkübasyonda siprofloksasine duyarlı olduğunu tespit ettik (%100). Siprofloksasin için yorumlama kategorisini istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde agar dilüsyonla E Test arasındaki uyumu %100 bulduk.

Agar dilüsyon ve E Test yöntemiyle rifampisin test edildiğinde; 48 saat sonunda agar dilüsyon yöntemi ile suşların 8'inin (%19) rifampisine azalmış duyarlılık gösterdiği, E Test-1 ve E Test-2 yöntemi ile ise rifampisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Agar dilüsyon yöntemi ile 72 saat sonunda ise izolatların 41'inin (%95), E Test-2 yöntemi ile 4'ünün (%9) rifampisine azalmış duyarlılık gösterdiği, E Test-1 yöntemi ile ise rifampisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Rifampisinin 48 saat inkübasyonda MİK değerleri karşılaştırıldığında agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 ve E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından anlamlı ilişki bulduk. Rifampisin test edildiğinde 72 saat sonunda; agar dilüsyonla E Test-1, agar dilüsyonla E Test-2 arasında bir ilişki bulunmazken, E Test-1'le E Test-2 arasında değerler açısından ilişki bulduk. Yorumlama kategorisine göre değerlendirdiğimizde; agar dilüsyon yöntemi ile 48 saat inkübasyonda rifampisine 43 suşun 35'inin (%81) duyarlı, 8'inin (%19) ise orta derecede duyarlı; 72 saat sonunda da 43 suşun 2'sinin (%5) duyarlı, 41'inin (%95) ise orta derecede duyarlı olduğunu saptadık. E Test-1 yönteminde 43 suşun hepsinin (%100) 48 ve 72 saatlik inkübasyonda rifampisine duyarlı olduğunu saptadık. E Test-2 yönteminde ise 48 saat inkübasyonda rifampisine 43 suşun hepsinin (%100) duyarlı; 72 saat sonunda ise 43 suşun 39'unun (%91) duyarlı, 4'ünün (%9) orta derecede duyarlı olduğunu saptadık. Her üç testi karşılaştırdığımızda; 48 saat inkübasyon sonunda 8 izolatı, agar

dilüsyon yöntem ile rifampisine orta derece duyarlı bulurken aynı 8 izolatu her iki E Test yöntemi ile duyarlı bulduk. İzolatlarımızdan 35'i, agar dilüsyon yöntemi ile rifampisine orta derece duyarlı bulurken aynı 35 izolatu her iki E Test yöntemi ile duyarlı bulduk. Bununla birlikte 72 saat inkübasyon sonunda ise; 41 izolatu, agar dilüsyon yöntemi ile rifampisine orta derece duyarlı bulurken E Test-1 yöntemi ile aynı 41 izolattı duyarlı bulduk, aynı şekilde 2 izolatu agar dilüsyon yöntemi ile rifampisine duyarlı bulurken E Test-1 yöntemi ile aynı 2 izolatu yine duyarlı bulduk. İzolatlarımızın 4'ünü, E Test-2 yöntemi ile rifampisine orta derece duyarlı bulurken agar dilüsyon yöntemi ile aynı 4 izolattı orta derece duyarlı bulduk. İzolatlarımızın 2'sini agar dilüsyon yöntemi ile rifampisine duyarlı bulurken, E Test-2 yöntemi ile aynı 2 izolatu yine duyarlı bulduk. Rifampisin için yorumlama kategorisini istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde agar dilüsyonla E Test arasındaki uyumu %83 bulduk.

Bu bulgular ışığında E Test yönteminin *B. melitensis* suşları için alternatif bir duyarlılık test yöntemi olarak kullanımının E Test yönteminin kolay uygulanabilir, basit, fazla zaman ve emek gerektirmemesi ve zon çaplarının net olarak görülebilmesinden dolayı MİK değerlerinin ve buna bağlı olarak duyarlılık paternlerinin doğru olarak saptanabilmesi nedeniyle uygun olacağını düşünüyoruz. *Brucella*'ların antimikrobiyal duyarlılığının saptanmasında standardizasyon oluşturmak için bruselloz tedavisinde kullanılan diğer antimikrobiyallerin de bu iki yöntemle karşılaştırılması olarak test edilmesini ve bizim çalışmamıza benzer ya da daha kapsamlı birçok çalışmanın yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

## ÖZET

TÜTF Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ocak 2002-Aralık 2004 tarihleri arasında hastalardan alınan 41 adet kan kültürü ve 2 adet eklem sıvısı örneğinden, standart metotlarla izole edilen ve *Brucella* olarak adlandırılan 43 suş çalışmaya alındı. İzole edilen suşlardan 42'si *B. melitensis* biyotip 3, 1'i *B. melitensis* biyotip 1 olarak adlandırıldı. Bu suşların in vitro olarak doksisisiklin, streptomisin, siprofloksasin ve rifampine duyarlılıkları agar dilüsyon referans yöntemi ve E Test yöntemi ile araştırılarak, 48 ve 72 saat sürenin sonunda CLSI agar dilüsyon referans yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Bütün izolatlar 48 ve 72 saat sonunda hem agar dilüsyon hem de E Test yöntemi ile doksisisiklin, streptomisin ve siprofloksasine duyarlı iken 48 saat sonunda agar dilüsyon yöntemi ile suşların 8'inin (%19) rifampisine azalmış duyarlılık gösterdiği, E Test-1 ve E Test-2 yöntemi ile ise rifampisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. İzolatların 72 saat sonunda ise; agar dilüsyon yöntemi ile 41'inin (%95), E Test-2 yöntemi ile 4'ünün (%9) rifampisine azalmış duyarlılık gösterdiği, E Test-1 yöntemi ile ise rifampisine duyarlı olduğu belirlenmiştir.

İki yöntem arasında MİK değerleri göz önüne alındığında; sadece streptomisin ve rifampisin test edildiğinde agar dilüsyon yöntemi ile E Test arasında uyum bulunurken, duyarlılık paterni göz önüne alındığında; doksisisiklin, streptomisin ve siprofloksasin test edildiğinde %100, rifampisin test edildiğinde %83 uyum bulunduğu belirlendi.

Bu bulgular ışığında E Test yönteminin *B. melitensis* suşları için alternatif bir duyarlılık test yöntemi olarak kullanımının sınırlı olacağı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Brucella melitensis*, antibiyotik duyarlılığı, E Test

**ASSESSMENT OF DOXYCYCLINE, RIFAMPIN, STREPTOMYCIN,  
CIPROFLOXACIN OF BRUCELLA STRAINS ISOLATED IN TRAKYA  
UNIVERSITY HOSPITAL BETWEEN 2002- 2004 WITH AGAR  
DILUTION AND E-TEST METHODS**

**SUMMARY**

In this study, 43 *Brucella* strains isolated by standard methods from 41 blood and 2 joint fluid samples of patients who administered to Clinical Microbiology Laboratory of Trakya University, Medical Faculty were examined. Forty-two of isolated strains were named as *B. melitensis* biotype 3 and one was named as *B. melitensis* biotype 1. In vitro sensitivity of these strains to doxycycline, streptomycine, ciprofloxacin and rifampin were determined using agar dilution method and E Test method, these findings were compared to results of CLSI agar dilution, which is reference method, at the end of 48 and 72 hour-periods.

All isolates were found to be sensitive to doxycycline, streptomycine and ciprofloxacin at the end of 48 and 72 hours by both agar dilution method and E Test method. At the end of 48 hour period, 8 of strains (19 %) showed decreased sensitivity to rifampin by agar dilution method, whereas E Test-1 and E Test-2 method revealed that these strains were sensitive to rifampin. At the end of 72 hours, however, 41 and 4 of strains (95% and 9%) showed reduced sensitivity to rifampin by agar dilution method and E Test-2 method, respectively, while increased sensitivity to rifampine was found by E Test-1 method.



In respect to MIC values between two methods, when only streptomycin and rifampin were tested, a concordance was found between agar dilution method and E Test. As sensitivity pattern was taken into account, when doxycycline, streptomycin and ciprofloxacin were tested, concordance rate was 100%, and with rifampin 83% of concordance was found.

With these findings, it is concluded that use of E Test method would be limited as an alternative sensitivity test method for *B. melitensis* strains.

**Key Words:** *Brucella melitensis*, antibiotic sensitivity, E Test

### **KAYNAKLAR:**

- 1- Badur S. Brusellozda serolojik tanı ve seroepidemioloji. Klimik Dergisi 1990; 3 (1):17-20.
- 2- Sözen TH. Bruselloz. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, (Editörler). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. 2 baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 636-642.
- 3- Young EJ. *Brucella* Species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, (Eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases 5 th ed. New York: Churchill Livingstone Inc., 2000; 2386-2392.
- 4- Hatipoğlu ÇA, Kınıklı S, Tülek N, Koruk ST, Arslan S, Ertem GT, Koruk İ, Demiröz AP. Bir eğitim hastanesinin infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji kliniğinde izlenen 202 Bruselloz olgusunun epidemiyolojik verilerinin irdelenmesi. Klimik Dergisi 2005; 18 (3):94-98.
- 5- Aygen B, Doğanay M, Sümerkan B, Yıldız O, Kayabaş U. Clinical manifestations, complications and treatment of brucellosis: a retrospective evaluation of 480 patients. Med Mal Infect 2003; 32:485-493.
- 6- Sümerkan B. Brusella türleri. Willke A, Söyletir G, Doğanay M, (Editörler). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. 2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 1647-1652.

- 7- Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamanstein L, Joseph G, et al. In vitro susceptibility of *B. melitensis* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 1925-1927.
- 8- Eşel D, Sümerkan B, Ayangil D, Telli M. *Brucella melitensis* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde agar dilüsyon ve e-test yöntemlerinin karşılaştırılması. *Aknem Dergisi* 2004;18(4): 196-199.
- 9- Gür D, Kocagöz S, Akova M, Ünal S. Comparison of e-test to microdilution for determining in vitro activities of antibiotics against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2337.
- 10- Turkmani A, Ioannidis A, Christidou A, Psaroulaki A, Loukaides F, Tselentis Y. In vitro susceptibilities of *B.melitensis* isolates to eleven antibiotics. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2006: 5:24.
- 11- Ayaşlıoğlu E, Kılıç S, Aydın K, Kılıç D, Kaygusuz S, Ağalar C. Antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* isolates from blood samples. *Turk J Med Sci* 2008; 38(3):257-262.
- 12- Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balcı İ. Synergy test by e-test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Mic* 2005; 43(1):140-143.
- 13- Yamazhan T, Aydemir Ş, Tünger A, Serter D. In vitro activities of various antimicrobial against *Brucella melitensis* strains in the Aegean region in Turkey. *Med Princ Pract* 2005; 14:413-416.
- 14- Marianelli C, Graziani C, Santelgelo C, Xibilia MT, Imbriani A, Amato R, et al. Moleculer epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. *Journal of Clinical Mic* 2007; 45(9):2923-2928.
- 15- Sözen TH. Bruselloz. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, (Editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1996: 486-491.
- 16- Baysal B. *Brucella*. Ustaçelebi Ş (Editör). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999: 572-577.
- 17- Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji*. 7.baskı. İzmir: Fakülteler Kitabevi, 1992:157-168.

- 18- Young EJ. *Brucella* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (Eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 4 th ed. New York: Churcill Livingstone Inc., 1995: 2053-2060.
- 19- Moyer NP, Holcomb LA, Hausler WJ. Brucella. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (Eds.) Manuel of Clinical Microbiology. 5 th ed. Atlanta, Georgia: Massachusetts, 1991: 457-461.
- 20- Corbel MJ. Microbiology of the genus *Brucella*. Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects. In: Young EJ, Corbel MJ, (Eds.). Florida, USA: CRC Pres, Inc., Boca Raton,1989: 54-67
- 21- Ugalde RA. Intracelluler lifestyle of *Brucella* spp. common genes with other animal pathogens, plant pathogens and endosymbionts. Microbes and Infec 1999; 1:1211-1219.
- 22- Aydın N. *Brucella* infeksiyonları, Özel Mikrobiyoloji, Bakteriyel İnfeksiyöz Hastalıklar. A. Ü. Vet. Fak. Yayınları. No: 386 Ankara: A. Ü. Basımevi, 1982: 225-254.
- 23- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Tanı 3.baskı. İzmir: Fakülteler Kitabevi, 2002: 475- 478.
- 24- Gürler N. Brusellozda bakteriyolojik tanı yöntemleri. Klimik Dergisi 1990; 3(1):21-22.
- 25- Holt J, Sneath P, Williams S, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore, Maryland: William&Wilkins, 1994: 137-138.
- 26- Mayc CHV, Weyant R: *Francisella* and *Brucella*. In; Murray R.P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Robert HY, (Eds.). Manuel of Clinical Microbiology 8 th ed. Herndon: Washington, DC, 2003: 797- 808.
- 27- Türkçapar N, Kurt H. Bruselloz. Uzun Ö, Ünal S (Editörler). Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları. 2. baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2002: 1015-1024.
- 28- Cloeckert A, Verger JM, Vizcaino N, Grayon M, Lago-Fernandez L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. Microb and Infec 2000; 2:1089-1100.
- 29- Corbel MJ. Brucellosis: an overwiev. Emerg Infect Dis 1997; 3(2):213-21.

- 30- Redkar R, Rose R, Bricker B, DelVecchio V. Real-time detection of *B.abortus*, *B.melitensis* ve *B.suis*. Mol and Cel Prob 2001; 15:43-52.
- 31- Michaux-Charachon S, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, Ramuz M, et al. Genome structure and phlogeny in the genus *Brucella*. Jour of Bact 1997: 3244-3249.
- 32- Blood DC, Radostits OM. Veterinary Medicine, 7th. Edition. Bailliere Tindall Ltd., London,1989: 677-697.
- 33- Boschiroli ML, Foulonge V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. Cur Opin Microbiol 2001; 4:58-64.
- 34- Kocabeyoğlu Ö, Koşan E, Öztürkeri H, Emekdaş G, Yılmaz M, Durgun T. Bruselloz tanısında çeşitli testlerin birlikte uygulanması ve sonuçların karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Der 1994; 24:30-33.
- 35- Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B, Herman LM. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. J Appl Microbiol 2000; 88:69-80.
- 36- Verger JM, Grimont F, Grayon M, Grimont F. *Brucella* a monospesific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. In Jour System Bacter 1985: 292-295.
- 37- Ficht TA, Husseinen HS, Derr J, Bearden S W. Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains. Int J Syst Bacteriol 1996; 46(1):329-331.
- 38- Bundle DR, Cherwonogrodzky J, Meikle PJ, Gidney M, Perry M, Peters T. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. Infec Immun 1989: 2829-2836.
- 39- Paquet JY, Diaz MA, Genevrois S, Grayon M, Verger JM, De Bolle X, Lakey JH, Letesson JJ, Cloeckaert A. Molecular, antigenik and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp. Jour of Bac 2001; 183(16):4839-4847.
- 40- Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolisaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. Infec and Immun 1995: 3945-3952.

- 41- Meikle PJ, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, Bundle DR. Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. *Infect. Immun* 1989; 57(9):2820-2828.
- 42- Young EJ. An overview of human Brusellosis. *Clin Inf Dis* 1995; 21:283-290.
- 43- Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Entry and intracellüler localization of *Brucella* spp. In vero cells: Fluorescence and electron microscopy. *Vet Pathol* 1990; 27:317-328.
- 44- Godfroid F, Taminiau B, Danese I, Denoel I, Tibor A, Weynants V, et al. Identification of the perosamine synthetase gene of *B. melitensis* 16M and Involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infec Immun.*1998: 5485-5493.
- 45- Cloeckeaert A, Verger JM, Weynants V, Godfroid J, Grayon M, Zygmunt MS. O-polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp. studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Clin Diag Lab Immun* 1998; 5(6):862-870.
- 46- Martin NL, Hancock REW. Function and structure of the major components of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Brucella*. *Advances in Brusellosis Research*,1st. edition, Edited by ADAMS, L. G., Texas A & M University Press., College Station, TX,USA, 1990: 55-75.
- 47- Ficht TA, Bearden SW, Marquis H. Phylogenetic markers to describe *Brucella abortus*. *Advances in Brusellosis Research*, 1st. edition, Edited by ADAMS, L. G., Texas A & M University Press., College Station, TX,USA, 1990: 36-52.
- 48- Şimşek H, Erdenliş S, Oral B, Tülek N. insan kaynaklı *Brucella* izolatlarının tip-biyotip tayini ve epidemiyolojik olarak irdelenmesi. *Klimik Dergisi* 2004; 17(2):103-106.
- 49- Altan N. Bruselloz epidemiyolojisi. Tümbay E, Anđ Ö, Karakartal G (Editörler) 1. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi; 1987 Nisan 20-23; İzmir, Türkiye. İzmir, Bilgehan Basımevi; 1987: 179- 185.
- 50- Yagupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *J Clin Microbiol* 1999: 3437-3442.
- 51- Queipo-Ortuno IM, Morata P, Manchado P, Manchado P. Rapid diagnosis of human brusellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997: 2927-2930.

- 52- Pizarro-Cerda J, Parton RG, Meresse S, Van Der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infec and Immun*. 1998; 5711-5724.
- 53- Taşova Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, İnal S, Aksu HSZ. Bruselloz: 238 erişkin olgunun klinik, laboratuvar ve tedavi özelliklerinin değerlendirilmesi. *İnfeks Derg* 1998; 12:307-312.
- 54- Erdoğan İ, Gürel A, Tekin C, Uyanık F, Bitgel A. Trakya bölgesinde koyun, keçi ve sığırlarda bakteriyel abortların tespiti ve dağılımı. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg* 1993; 24(1): 23-25.
- 55- Erdenliğ S, Şen A. Koyun atıklarından brusella cinsi mikroorganizmaların izolasyonu ve biyotiplendirilmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg* 2000; 31(2):31-42.
- 56- Bolca Z, Gündeş S, Erdenliğ S, Öztürk R, Sümerkan B, Akata F. İnsan kaynaklı *Brucella* türü mikroorganizmaların tiplendirilmesi amacı ile uygulanan metodların karşılaştırılması ve biyotipleri ile faj tipleri arasındaki ilişkinin irdelenmesi. *Flora Derg* 2002; 7(3):157-170.
- 57- T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Çalışma Yıllığı. 2005 <http://www.saglik.gov.tr>
- 58- Young EJ: Serologic diagnosis of human Brucellosis. Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev Infec Dis*1991; 13:359-372
- 59- Tanakol R, Tanakol M, Aral O, Alpan H. Lökomotor sistem tutulması görülen bruselloz olgularının tedavisinde streptomisin ve tetrasiklin ile rifampin ve tetrasiklin uygulamasının karşılaştırılması. *Klimik Derg* 1990; 3(1):30-32.
- 60- Aygen B, Sümerkan B, Kardaş Y, Doğanay M, İnan M. Bruselloz: 183 olgunun değerlendirilmesi. *Klimik Derg* 1995; 8(1):13-16.
- 61- Serter D, Dereli D, Çavuşoğlu C, Kabalak T. Epididimo-Orşit ve tiroidit komplikasyonları ile seyreden bir bruselloz olgusu. *Türk Mikrobiol Cem Derg* 23:151-152.
- 62- Cesur S, Çapar Y, Demir P, Kurt H, Sözen TH, Tekeli E. Brusella orşiti: dört olgunun incelenmesi. *Klimik Derg* 2002;15(1):22-24.

- 63- Şenel Ş, Yamazhan T, Gökengin D. Akut prostatit ile seyreden seronegatif bir bruselloz olgusu. *Klimik Derg* 2004; 17(3):209-210.
- 64- Özsoy- Hitit G, Özyürek SÇ, Karagül E. *Brucella melitensis*'in neden olduğu bir prostetik kapak endokarditi olgusu. *Klimik Derg* 2005; 18(2):75-76.
- 65- Yavuz AS, Adalet K, Rasim B, Dilmener M, Çalangu S. *Brucella* karditi: bir vaka bildirisi. *Klimik Derg* 1991; 4(1):36-37.
- 66- Sırmatel F, Özgöztaş O, Baydar İ. Cilt döküntüsü ile seyreden bir bruselloz olgusu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1993; 23:12-14.
- 67- Başak M, Gül S, Gözaydın M, Koçak N, Özsoy MF, Çankır Z, Yenen OŞ, Danacı M. Derin hemolitik anemi ile seyreden bir bruselloz olgusu. *Klimik Derg* 1997; 10(3): 152-154.
- 68- Heper Y, Yılmaz E, Akalın H, Mısıtık R, Helvacı S. Nörobruselloz: 9 olgunun irdelenmesi. *Klimik Derg* 2004; 17(2):99-102.
- 69- Tümtürk A, Yetkin MA, Tülek N, Kılıç D. Brusellozun tanı ve takibinde serum aglütinasyon testi ve "enzyme- linked immunosorbent assay " yönteminin yeri. *Klimik Derg* 2004;17(2):107-112.
- 70- Koneman EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn CW. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997: 431-436.
- 71- Gotuzzo E, Carrillo C, Guerra J, Llosa L. An evaluation of diagnostic methods for Brucellosis- the value of bone marrow culture. *Jour Infec Dis* 1986; 153(1):122-125.
- 72- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3.baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 2002: 227-228.
- 73- Yakupsky P. Detection of *B.melitensis* by BACTEC NR 660 blood culture system. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:1899-1901
- 74- Özdemir M, Doğan M, Baysal B. Brusellozun serolojik tanısında yeni bir yöntem: immüncapture aglütinasyon testi. *Genel Tıp Derg* 2007; 17(1): 9-13.
- 75- Solera J, Martinez- Alfaro E, Espinosa A. Recognition and optimum treatment of brucellosis, *Drugs* 1997; 53(2):245-256.



- 76- Akova M, Gür D, Livermore D, Kocagöz T, Akalın HE. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *B.melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(5):1298-1300.
- 77- Kocagöz S, Akova M, Altun B, Gür D, Haşçelik G. In vitro activities of new quinolones against *B. melitensis* isolated in a tertiary-care hospital in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2002; 2:240-242.
- 78- Yao JCD, Moellering A. Antimicrobial agents. In: Murray RP, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover HC, (Eds.). *Manuel of Clinical Microbiology* 8 th ed. Herndon: Washington, DC, 2003: 1041-1060.
- 79- Çokça F. Tetrasiklinler. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, (Editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. 2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 245-248.
- 80- Parlak M. Tetrasiklinler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). *Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 2003: 375-378.
- 81- Willke TA. Aminoglikozitler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). *Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 2003: 313-323.
- 82- Willke TA. Aminoglikozitler. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, (Editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. 2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 214-222.
- 83- Erol S. Rifampisin. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). *Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 2003: 417-421.
- 84- Leblebicioğlu H. Parenteral Sefalosporinler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). *Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 2003: 375-378.
- 85- Wilke TA. Kinolonlar. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, (Editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. 2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 234-244.
- 86- Hussain SM, Akhtar M, Ueno Y, Al-Sibai MB. Susceptibility of *B. melitensis* to fluoroquinolones. *Drugs Exptl Clin Res* 1989; 15(10):483-485.
- 87- Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamanstein L, Joseph G, et al. In vitro susceptibility of *B. melitensis* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1991: 1925-1927.

- 88- Garcia- Rodriguez JA, Garcia Sanchez JE, Trujillano I, Garcia Sanchez E, Garcia Garcia MI, Fresnadillo MJ. Susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to clinafloxacin and four other new fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(5):1194-1195.
- 89- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3.baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 2002: 677.
- 90- Rodriguez G, Sanchez G, Trujillano I. Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against *Brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;756-759.
- 91- Hall WH: Modern chemotherapy for Brucellosis in humans. *Rev Infect Dis* 1990; 12(6): 1060-1099.
- 92- Sub-committee on Susceptibility Testing of Intracellular and Cell-associated Pathogens of the European Committee for Antim Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Discussion Document E.Dis 6.1.2001. [http://www.escmid.org/Files/E Def 6 1 03 2001.pdf](http://www.escmid.org/Files/E%20Def%206%201%2003%202001.pdf)
- 93- Rodriguez G, Bellido M, Fresnadillo MJ, Trujillano I. In vitro activities of new macrolides and rifapentine against *Brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1993: 911-913.
- 94- Palenque E, Otero J, Noriega AR. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to new cephalosporins crossing the blood-brain barrier. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986: 182-183.
- 95- Al-Sibai MB, Halim M, El-shaker M, Khan BA, Qadri SMH. Efficacy of ciprofloxacin for treatment of *B. melitensis* Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1992: 150-2.
- 96- Hindler J. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Isenberg HD, *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington: ASM Pres; 1992; Ch 5; 5.1.1- 5.25.1
- 97- Koneman EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn CW. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed, Philadelphia: Lippincott, 1997: 816-818.
- 98- Trujillano-Martin I, Garcia-Sanchez E, Martinez MI, Fresnadillo MJ, Garcia-Sanchez JE Garcia-Rodriguez JA. In vitro activities of six new fluoroquinolones against *B. melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999: 194- 195.
- 99- Güvener E, Çöplü N. Antibiyotik duyarlılık testleri ve standardizasyon. Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi; 1996.

- 100- Clinical Laboratory Standarts Institute. Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları; Onaltıncı bilgi eki. M-100-S17 (ISBN: 978-975-6058-28-2) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensylvania 19087-1898 U.S.A 2007.
- 101- Clinical Laboratory Standarts Institute. Aerop üreyen bakteriler için dilüsyon yöntemi ile antimikrobik duyarlılık testleri. 6.baskı. M7-A7, (ISBN: 978-975-6058-21-3) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensylvania 19087-1898 U.S.A 2006.
- 102- Koneman EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn CW. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed, Philadelphia: Lippincott, 1997: 826-827.
- 103- Turan H, Arslan H, Uncu H, Azap Ö, Şerefhanoglu K. Tigesiklinin *Brucella* suşlarına in vitro etkinliğinin doksisisiklin, siprofloksasin ve rifampisininin etkinliği ile karşılaştırılması. İnfeksiyon Derg. 2007; 21(3):147-151.
- 104- Yüce A, Alp-Çavuş S. Türkiye’de bruselloz: genel bakış. Klimik Derg 2006; 19(3): 87-97.
- 105- Özsüt H. Bruselloz tedavisi. Klimik Dergisi. 1990; 3:20-26.
- 106- Colmenero JD, Fernandez LC, Agundez JA, Senedo J, Benitez J, Valverde E. Possible implications of doxycycline-rifampin interaction for treatment of Brucellosis. Antimicrob Agents Chemother 1994: 2798-2802.
- 107- Turan H, Arslan H, Uncu H, Azap Ö. Tigesiklinin *Brucella* suşlarına in vitro etkinliğinin doksisisiklin, siprofloksasin ve rifampisininin etkinliği ile karşılaştırılması. İnfeksiyon Dergisi 2007; 21(3):147-151.
- 108- Carryn S, Chanteux H, Seral C, Mingeot-leclercq MP, Van Bambeke F, Tulkens P. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. Infect Dis Clin N Am 2003; 17:615-634.
- 109- Kılıç S, Dizbay M, Hizel K, Arman D. In vitro synergistic activity of antibiotic combinations against *Brucella melitensis* using e-test methodology. Brazilian J Microb 2008; 39: 233-237.
- 110- Ariza J, Bosch J, Gudiol F et al. Relevance of in vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis, Antimicrob agents chemother 1986; 30: 958-960.

- 111- Bosch J, Ariza J, Linares J, Jopes MJ, Cisnal MC, Martin R. In vitro activity of ciprofloxacin, ceftriaxone and five other antimicrobial agents against 95 strains of *B. melitensis*. 1986; 17:459-461.
- 112- Bodur H, Balaban N, Aksaray S, Yetener V, Akıncı E, Çolpan A, Erbay A. Biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates. Scand J Infect Dis 2003;35: 337-338.
- 113- Köse Ş, Kılıç S, Özbel Y. Identification of *Brucella* species isolated from proven brucellosis patients in İzmir, Turkey 2005; 45(4): 323-327.
- 114- Baykam N, Esener H, Ergönül Ö, Eren Ş, Çelikbaş AK, Dokuzoğuz B. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. Int J Antimicrob Agents 2004; 23:405-407.
- 115- Zer Y, Namıduru M, Çam R. Kan kültüründen izole edilen *Brucella melitensis* suşlarına tigesiklinin in- vitro etkinliği. Ankem Derg 2007; 21(1):42-45.
- 116- Kaya-Fırat S, Oral B, Erdiñç FS, Yetkin MA, Tulek N, Demiröz AP. In vitro activity of antimicrobial agent combinations against *Brucella melitensis* isolates by E- test. Ankara, Samsun, TR 1293.
- 117- Rolain JM, Maurin M, Rault D. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *Brucella* spp.: clinical implications. Jour Antimicrob Chemot 2000; 811-814.
- 118- Garcia-Rodriguez JA, Garcia Sanchez JE, Trujillano I, Bellido JL. In vitro activity of new quinolones against *B. melitensis*. Rev Inf Dis 1989; 11(5):992-993.
- 119- Doğanay M, Aygen B. Use of ciprofloxacin in the treatment of Brucellosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1992; 12:66.
- 120- Yamazhan T, Aydemir Ş, Tünger A, Serter D, Gökengin D. In vitro activities of various antimicrobials against *B. melitensis* strains in the aegean region in turkey. Med Princ Pract 2005; 14: 413-416.
- 121- Khan MY, Dizon M, Kiel F. Comparative in vitro activities ofloxacin, difloxacin, siprofloxacin and other selected antimicrobial agents against *B. melitensis*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:1409-10.
- 122- Kinsara A, Al- Mowallad A, Osaba AO. Increasing resistance of *Brucellae* to cotrimoxazole. Antimicrob agents chemother 1999; 43:1531.

- 123- Kuloğlu F, Erdenliğ S, Akata F, Tansel O, Gircan S, Tuđrul HM. Species and biovar distribution of *Brucella* isolates in Trakya University Hospital between 1997-2002. Mikrobiyol bul 2004; 38(3): 187-191.

## RESİM LİSTESİ

### Sayfa No:

Resim 1: Besiyeri kontrol petrisi .....	64
Resim 2: Antibiyotiksiz besiyeri kontrol petrisi.....	64
Resim 3: Doksisisiklin içeren petrilere 48 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü .....	65
Resim 4: 0.125 µg/ml doksisisiklin içeren petride 72 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü .....	65
Resim 5: Streptomisin içeren petrilere 48 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü .....	66
Resim 6: 2 µg/ml streptomisin içeren petride 72 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü .....	66
Resim 7: Sipofloksasin içeren petrilere 48 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü .....	67
Resim 8: 0.25 µg/ml sipofloksasin içeren petride 72 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü .....	67
Resim 9: Rifampisin içeren petrilere 48 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü .....	68
Resim 10: 1 µg/ml rifampisin içeren petride 72 saat inkübasyonda bakteri kolonilerinin görünümü .....	68

Resim 11: Doksisiklin ve streptomisin E Test ile test edildiğinde 48 saat inkübasyonda oluşan inhibisyon zonu ve MİK değerleri (32. izolatımıza ait).....	69
Resim 12: Doksisiklin ve streptomisin E Test ile test edildiğinde 72 saat inkübasyonda oluşan inhibisyon zonu ve MİK değerleri (32. izolatımıza ait).....	69
Resim 13: Rifampisin ve siprofloksasin E Test ile test edildiğinde 48 saat inkübasyonda oluşan inhibisyon zonu ve MİK değerleri (32. izolatımıza ait).....	70
Resim 14: Rifampisin ve siprofloksasin E Test ile test edildiğinde 72 saat inkübasyonda oluşan inhibisyon zonu ve MİK değerleri (32. izolatımıza ait).....	70

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No:

Tablo 1: <i>Brucella</i> cinsi bakterilerinin ortak biyoşimik özellikleri .....	6
Tablo 2: <i>Brucella</i> türlerinin boyalarda üreme özellikleri, CO <sub>2</sub> 'e ihtiyaçları ve H <sub>2</sub> S oluşumu.....	7
Tablo 3: <i>Brucella</i> genus üyelerinin fajlara karşı duyarlılıklarındaki farklar .....	8
Tablo 4: <i>Brucella</i> türlerinin ayırıcı özellikleri.....	8
Tablo 5: <i>Brucella</i> genus üyelerinin tür ve biyotiplerin ayırıcı özellikleri .....	9
Tablo 6: Türkiye’de yıllara göre bruselloz .....	17
Tablo 7: <i>Brucella</i> kontrol suşlarının ve test izolatlarının tür ve biyotiplendirme testlerinde gösterdikleri reaksiyonlar .....	39
Tablo 8: Antimikrobiyal maddeler için eritici ve seyreltme sıvıları .....	42
Tablo 9: Standart kökenlerinin MİK değerleri.....	46
Tablo 10: Standart <i>Brucella</i> kökenlerinin MİK değerleri .....	47
Tablo 11: Agar dilüsyon ile elde edilen MİK <sub>50</sub> , MİK <sub>90</sub> değerleri ve MİK aralıkları.....	47
Tablo 12: E Test-1 ile elde edilen MİK <sub>50</sub> , MİK <sub>90</sub> değerleri ve MİK aralıkları.....	48
Tablo 13: E Test-2 ile elde edilen MİK <sub>50</sub> , MİK <sub>90</sub> değerleri ve MİK aralıkları .....	48
Tablo 14: Doksisisiklin için agar dilüsyon ve E Test-1 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları .....	49
Tablo 15: Doksisisiklin için agar dilüsyon ve E Test-2 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları .....	50
Tablo 16: Streptomisin için agar dilüsyon ve E Test-1 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları .....	51



Tablo 17: Streptomisin için agar dilüsyon ve E Test-2 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları .....	52
Tablo 18: Siprofloksasin için agar dilüsyon ve E Test-1 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları .....	53
Tablo 19: Siprofloksasin için agar dilüsyon ve E Test-2 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları .....	54
Tablo 20: Rifampisin için agar dilüsyon ve E Test-1 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları .....	55
Tablo 21: Rifampisin için agar dilüsyon ve E Test-2 yöntemi ile tespit edilen MİK değerleri ve duyarlılık- dirençlilik durumları .....	56
Tablo 22: CLSI Kriterlerine Göre Sınır Değerler .....	57
Tablo 23: Agar dilüsyon yöntemiyle yorumlama kategorisine giren bakteri sayısı ve yüzdeleri .....	57
Tablo 24: E Test-1 yöntemiyle yorumlama kategorisine giren bakteri sayısı ve yüzdeleri .....	57
Tablo 25: E Test-2 yöntemiyle yorumlama kategorisine giren bakteri sayısı ve yüzdeleri .....	57
Tablo 26: Doksisisiklin için korelasyon analiz sonuçları .....	58
Tablo 27: Streptomisin için korelasyon analiz sonuçları .....	58
Tablo 28: Siprofloksasin için korelasyon analiz sonuçları.....	58
Tablo 29: Rifampisin için korelasyon analiz sonuçları .....	59

## **ÖZGEÇMİŞ**

1971 Aydın doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Ankara, lise öğrenimimi İzmir’de tamamladım.1995 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden mezun oldum. 2002 Bahar döneminde Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji alanında doktora eğitimime başladım. Halen İstanbul’da Sağlık Bakanlığı’na bağlı tabip kadrosunda görev yapmaktayım.

## **EKLER**

**Ek 1. Etik kurul kararı**

## EK 1.

### Etik kurul kararı



T.C  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı : 06

Karar Tarihi : 05.05.2005

8-Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 05.05.2005 tarihinde "2002-2004 yılları arasında T.Ü.Tıp Fakültesinde İzole Edilen Brucella kökenlerinde doksisisiklin, rifampisin, streptomisin, siproflöksasin duyarlılığının agar dilüsyon ve E-Test yöntemleriyle saptanması" adlı TÜTFEK-2005/56 protokol no.lu Araş.Gör.Dr.Arzu F.ERTEM'in tez çalışmasını incelemek üzere toplandı.

Yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Fakültemiz Klinik Bakteriyooloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalında yapılacağı ve sorumlusunun Yrd.Doç.Dr.Figen KULOĞLU olduğu; araştırma protokolünün amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler ile gönüllü bilgilendirme metni dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Helsinki Deklerasyonu Kararlarına, Hasta Hakları Yönetmeliğine ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına TÜBAP tarafından desteklenmesi koşuluyla; yapılabileceğine mevcudun oybirliği ile karar verildi.

Prof.Dr.Ahmet ULUGÖL  
BAŞKAN  
(Farmakolog)

Prof.Dr.Ahmet TEZEL  
Klinisyen Üye  
İç Hastalıkları Uzmanı

Yrd.Doç.Dr.Ümit N. BAŞARAN  
Klinisyen Üye  
Çocuk Cerrahisi Uzmanı

Yrd. Doç. Dr. Cengiz TUĞLU  
Klinisyen Üye  
Psikiyatri Uzmanı

Yrd. Doç. Dr.Ufuk USTA  
Üye  
Patalog

Yrd.Doç.Dr.Sevgi ESKİOCAK  
Biyokimya Uzmanı

Ecz.İmran OĞUZ  
Üye  
Eczacı

Posta Adresi :  
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı  
Güllapoğlu Yerleşkesi  
22030 EDİRNE

Tel ( 0-284) 235 76 41 (9 Hat) Fax: ( 0-284)2357652